

M.H

PCT/EP99/05386

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

28 February 2000 (28.02.00)

International application No.

PCT/EP99/05386

Applicant's or agent's file reference

M/39091-PCT

International filing date (day/month/year)

27 July 1999 (27.07.99)

Priority date (day/month/year)

27 July 1998 (27.07.98)

Applicant

GIESING, Michael et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

13 January 2000 (13.01.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Claudio Borton



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
FÜR DAS GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/39091-PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/05386	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/07/1999
(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 27/07/1998	
Anmelder GIESING, Michael et. al.	

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38 2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr.

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05386

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N5/06 C12M3/06 C12Q1/68 A61K35/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HIRTE, H.W. ET AL.: "A rapid and simple method for the purification of tumor cells from ascites fluid of ovarian carcinoma" GYNECOLOGIC ONCOLOGY, Bd. 44, 1992, Seiten 223-226, XP002122420 Seite 224, erste Spalte, erster Paragraph und Zeilen 6-8 des zweiten Paragraphs; Seite 225, erste Spalte, Zeilen 18-24; Seite 226, erste Spalte, letzter Satz ---	1,2,4,5, 7,9-14
X	EP 0 483 506 A (MICROBYX CORP) 6. Mai 1992 (1992-05-06) Spalte 2, Zeilen 20-50 ---	1,5,7,9
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

- A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

3 Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. November 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Alt, G



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SHANTZ, G.D. ET AL.: "Tumour metastasis and cell deformation: Assessment of nucleopore filtration" TREATMENT OF METASTASIS: PROBLEMS AND PROSPECTS, 1985, Seiten 291-294, XP002122422 siehe Tabelle 1 ---	10-13,15
X	PITTMAN K ET AL: "Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood" ANNALS OF ONCOLOGY, NL, KLUWER, DORDRECHT, Bd. 7, 1996, Seite 297-301 XP002092615 ISSN: 0923-7534 siehe Seite 299, erste Spalte ---	8
A	RYE, P.D. ET AL.: "Immunobead filtration: A novel approach for the isolation and propagation of tumor cells" THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 150, Nr. 1, 1997, Seiten 99-106, XP002122421 das ganze Dokument ---	1
A	EP 0 584 715 A (KUEBLER GMBH DR) 2. März 1994 (1994-03-02) das ganze Dokument ---	1
A	EP 0 806 666 A (SYNTRON BIORESEARCH INC) 12. November 1997 (1997-11-12) das ganze Dokument ---	1
P,X	WO 99 10528 A (UCIECHOWSKI PETER ;AUSTRUP FRANK (DE); EDER CLAUDINE (DE); FEIFEL) 4. März 1999 (1999-03-04) siehe Seiten 28-47, Referenzbeispiele 1-11 -----	8,10-15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

T/EP 99/05386

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0483506	A	06-05-1992	AT 156186 T	15-08-1997
			CA 2050773 A	26-03-1992
			DE 69127047 D	04-09-1997
			JP 4258764 A	14-09-1992

EP 0584715	A	02-03-1994	DE 4228389 A	03-03-1994
			AT 174959 T	15-01-1999
			DE 4244715 A	28-04-1994
			DE 9321535 U	05-08-1999
			DE 59309239 D	04-02-1999
			ES 2126618 T	01-04-1999
			GR 3029774 T	30-06-1999
			JP 6205671 A	26-07-1994
			US 5529903 A	25-06-1996

EP 0806666	A	12-11-1997	US 5821073 A	13-10-1998
			JP 10010125 A	16-01-1998

WO 9910528	A	04-03-1999	DE 19736691 A	25-02-1999



PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 5/06, C12M 3/06, C12Q 1/68, A61K 35/12	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/06702 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Februar 2000 (10.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05386 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Juli 1999 (27.07.99) (30) Prioritätsdaten: 198 33 738.8 27. Juli 1998 (27.07.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: GIESING, Michael [DE/DE]; Berghäuser Strasse 295, D-45659 Recklinghausen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): AUSTRUP, Frank [DE/DE]; Forellstrasse 25b, D-45663 Recklinghausen (DE). (74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter, Kinzebach und Partner, Sternwartstrasse 4, D-81679 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: CANCER CELLS FROM BODY FLUIDS CONTAINING CELLS, ISOLATION THEREOF AND AGENTS CONTAINING THE SAME		
(54) Bezeichnung: KREBSZELLEN AUS ZELLHALTIGEN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN, DEREN ISOLIERUNG, VERWENDUNG SOWIE DIESE ENTHALTENDE MITTEL		
(57) Abstract <p>The present invention relates to a method for isolating cancer cells from body fluids containing cells. The invention also relates to sets for carrying out said method, cancer cells isolated from body fluids, cell lines established therefrom or derived cell constituents, the use thereof as therapeutic agents or targets, and pharmaceutical or veterinary products containing them. The inventive method is based on the idea that body fluids containing cells are comprised of different sized and different shaped cells and groups of cells. According to the invention, body fluids containing cells or fractions of said body fluids are filtered in a sieve that retains cancer cells. The isolation and characterization of cancer cells is highly important, especially in the field of oncology, in order to respond to questions related to diagnostics, prognoses, therapeutics and scientific matters in human medicine and veterinary medicine. The inventive method also enables cancer cells to be removed totally from fluids or fractions (isolates) thereof containing cells. The isolated cancer cells, cell lines established therefrom and derived cell constituents reflect a substantially native i.e. biological state that can be associated with corresponding cancer cells in a body fluid.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Krebszellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten; Sets zur Durchführung dieses Verfahrens; aus Körperflüssigkeiten isolierte Krebszellen; daraus etablierte Zelllinien oder abgeleitete Zellbestandteile; deren Verwendung als Therapeutika oder Target; und diese enthaltende pharmazeutische oder tierarzneiliche Mittel. Das erfindungsgemäße Verfahren beruht darauf, daß in einer zellhaltigen Körperflüssigkeit Zellen und Zellaggregate unterschiedlicher Größe und Gestalt anzutreffen sind. Erfindungsgemäß werden eine zellhaltige Körperflüssigkeit oder Teile davon durch ein Sieb geführt, das Krebszellen zurückhält. Die Isolierung und Charakterisierung von Krebszellen ist vor allem im Bereich der Onkologie für die Beantwortung diagnostischer, prognostischer, therapeutischer und wissenschaftlicher Fragestellungen sowohl im tierexperimentellen als auch im humanmedizinischen Bereich von großer Bedeutung. Darüber hinaus dient das erfindungsgemäße Verfahren zur, gegebenenfalls vollständigen, Entnahme von Krebszellen aus zellhaltigen Flüssigkeiten oder zellhaltigen Fraktionen (Isolaten) davon. Die isolierten Krebszellen, daraus etablierte Zelllinien und abgeleitete Zellbestandteile spiegeln einen im wesentlichen nativen, d.h. biologischen Zustand wieder, der entsprechenden Krebszellen in der Körperflüssigkeit zugeordnet werden kann.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbogen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IT	Italien	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Canada	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Cote d'Ivoire	KR	Republik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KZ	Kasachstan	PT	Portugal		
CN	China	LC	St. Lucia	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LI	Liechtenstein	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LK	Sri Lanka	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LR	Liberia	SE	Schweden		
DK	Dänemark			SG	Singapur		
EE	Estland						

KREBSZELLEN AUS ZELLHALTIGEN
5 KÖRPERFLÜSSIGKEITEN, DEREN ISOLIERUNG, VERWENDUNG SOWIE
DIESE ENTHALTENDE MITTEL

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung
von Krebszellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten; Sets zur
10 Durchführung dieses Verfahrens; aus Körperflüssigkeiten
isolierte Krebszellen; daraus etablierte Zelllinien oder
abgeleitete Zellbestandteile; deren Verwendung als Therapeutika
oder Target; und diese enthaltende pharmazeutische oder
tierarzneiliche Mittel.

15 Das erfindungsgemäße Verfahren beruht darauf, daß in einer
zellhaltigen Körperflüssigkeit Zellen und Zellaggregate
unterschiedlicher Größe und Gestalt anzutreffen sind. Die
Isolierung und Charakterisierung von Krebszellen ist vor allem
20 im Bereich der Onkologie für die Beantwortung diagnostischer,
prognostischer, therapeutischer und wissenschaftlicher
Fragestellungen sowohl im tierexperimentellen als auch im
humanmedizinischen Bereich von großer Bedeutung. Darüber hinaus
dient das erfindungsgemäße Verfahren zur, gegebenenfalls
25 vollständigen, Entnahme von Krebszellen aus zellhaltigen
Flüssigkeiten oder zellhaltigen Fraktionen (Isolaten) davon.
Die isolierten Krebszellen, daraus etablierte Zelllinien und
abgeleitete Zellbestandteile spiegeln einen im wesentlichen
nativen, d.h. biologischen Zustand wieder, der entsprechenden
30 Krebszellen in der Körperflüssigkeit zugeordnet werden kann.

Die Isolierung von Krebszellen zur Durchführung von in-vitro
oder ex-vivo Untersuchungen ist beispielsweise dann
unproblematisch, wenn ein Primärtumor lokalisiert wurde und
35 somit eine Gewebeprobe der Untersuchung zugrundegelegt werden
kann. In diesem Sinne beschreibt beispielsweise das US-Patent
5,242,806 einen Chemosensibilitätstest an Tumorzellen aus
Biopsiematerial. Auch das in dem US-Patent 5,023,172

beschriebene MTS-System zum Austesten von tumorinaktivierenden Wirkstoffen geht von Biopsiematerial aus. Dieses wird mit Trypsin behandelt und anschließend zu einer Feeder-Zellen-Suspension gegeben, um multizelluläre Tumorsphäroide zu bilden.

5

Ist hingegen kein Tumor lokalisiert worden und steht deshalb kein Gewebe zur Verfügung, so ergeben sich Probleme. Zwar weiß man, daß sich unter Umständen auch in Körperflüssigkeiten Krebszellen aufspüren lassen, aufgrund der geringen

10 Konzentration an Krebszellen in Körperflüssigkeiten sind entsprechende Analysen jedoch technisch extrem schwierig. Deshalb wird die Aussagekraft derartiger Analysen vor allem durch die klassische Medizin häufig in Zweifel gezogen.

15 So kann im Rahmen der Identifizierung und Charakterisierung disseminierter Krebszellen - wozu insbesondere tumoröse Zellen gehören, die sich vom Primärtumor, von Metastasen und/oder Rezidiven abgelöst haben und in Körperflüssigkeiten zirkulieren - die Isolierung von Krebszellen entscheidende Bedeutung haben.

20 Mißt man beispielsweise die Expression relevanter Gene durch Zellen einer zu untersuchenden Körperflüssigkeit, so ist eine Isolierung von Krebszellen dann nicht erforderlich, wenn die relevanten Gene von den üblicherweise in der Körperflüssigkeiten vorhandenen, nicht entarteten Zellen nicht

25 oder nur in sehr geringem Maße exprimiert werden. Werden dagegen die relevanten Gene auch von den nicht entarteten Zellen exprimiert, ist es erforderlich, disseminierte Krebszellen zunächst zu isolieren und dann die Expression relevanter Gene zu messen. In diesem Falle bietet eine

30 quantitative Analyse zur Expression bestimmter z.B. tumorbiologisch relevanter Nukleinsäuren (z.B. FAS-Ligand, FAS-Rezeptor, bax, bcl-2, Ki-67, Cycline, Adhesionsmoleküle) die Möglichkeit der Expressionszuordnung zum Tumorisolat.

35 Zwecks Charakterisierung der Tumorzellen ist es sinnvoll, genomische Veränderungen der Tumorzellen auf DNA-Ebene zu analysieren. Bestimmungen wie "LOH (loss of heterozygosity), Mutationen, Amplifikationen etc." bedürfen einer extrem reinen

Population von Tumorzellen, da verunreinigende "Wildtyp-Zellen" potentielle Genomveränderungen überdecken und so diese nicht mehr detektierbar machen. Durch das vorliegende Verfahren werden kontaminierende, wildtypexprimierende Zellen wenigstens
5 soweit entfernt, daß genomische Veränderungen der Krebszellen meßbar sind. Wildtyp-Zellen, z.B. CD45-positive Zellen, können dann als Bezugsgröße zur Messung von z.B. LOH's, Amplifikationen und Mutationen dienen.

- 10 Bekannte zu Isolationszwecken angebotene Verfahren führen vielfach zu einer lediglich unspezifischen Anreicherung von Krebszellen. Auch das in der US-A-5,529,903 beschriebene Leukopherese-Verfahren bietet keine spezifische Anreicherung von Krebszellen, sondern liefert Fraktionen, die zum
15 überwiegenden Teil aus mononukleären Zellen bestehen, wie sie auch mit herkömmlichen Dichtegradienten erhalten werden können.

- Die DE 40 062 93 A1 gibt ein Trennmittel aus Polyvinylacetalharz an, mit dem Zellen aus Suspensionen
20 abgetrennt werden können. Dieses Verfahren ist eine Weiterentwicklung der schon lange bekannten Nylonwolle-Aufreinigung von T-Lymphozyten. Grundprinzip ist auch hier die präferentielle Adsorption von B-Zellen und Makrophagen/Monozyten an das Trennmittel.

- 25 Auch mit dem in der europäischen Patentanmeldung EP 0 448 837 A2 beschriebenen Verfahren werden Zellen aus einer Suspension unspezifisch auf einem Filter aufkonzentriert, wobei der dazu angelegte Druck Rückschlüsse auf die Zellzahl zuläßt.

- 30 Zur Vermeidung von gynäkologischen Abstrichen schlägt die EP 0 483 506 A1 vor, Menstruationsblut zu filtrieren. Der Filter wird so gewählt, daß rote und weiße Blutzellen die Filterporen passieren können. Die übrigen, auf dem Filter zurückgehaltenen
35 Zellen werden dann einer Papanicolaou-Färbung unterzogen, und es wird die übliche cytodiagnostische Beurteilung des Zellbildes vorgenommen, um normale von anormalen Zellen zu unterscheiden.

Zum raschen Sammeln und Konzentrieren von Zellen aus großen Flüssigkeitsmengen wie Mundspülungen dient das in dem US-Patent 5,578,459 beschriebene Verfahren. Eine Auftrennung von Zellgemischen wird nicht gelehrt. Auch nach dem in der
5 japanischen Anmeldung JP-5-252996A beschriebenen Verfahren sollen alle Zellen aus einer Lösung auf einen Filter gebracht werden. Dies gilt ebenfalls für das in JP-07143898A beschriebene Verfahren.

10 Dagegen kann die Isolierung von disseminierten Krebszellen bekanntermaßen mit Verfahren gelingen, bei denen die Krebszellen so markiert werden, daß sie von nicht entarteten Zellen zu unterscheiden sind und aufgrunddessen aussortiert werden können. Neben der klassischen Säulentechnik werden zu
15 diesem Zweck beispielsweise auch sogenannte "Cross-Flow" und "Through-Flow" Filter beschrieben, die mit spezifischen Liganden beladen sind (z.B. in der WO 96/06158, die allerdings nicht auf Tumorzellen abstellt).

20 Die überwiegende Anzahl derartiger Verfahren beruht auf einer antigenspezifischen Immunadsorption. Antikörper gegen bestimmte tumorspezifische oder epitheliale Zelloberflächenmoleküle werden beispielsweise mit fluoreszierenden und insbesondere magnetischen Markern versehen. Diese Verfahren haben den
25 Nachteil, daß durch eine Quervernetzung der Oberflächenantigene unkalkulierbare Effekte, wie Apoptose, Anergie, Aktivierung und weitere Zustandsänderungen der Zellen auftreten können. Derartige Effekte können das Bild einer anschließenden Charakterisierung der isolierten Krebszellen drastisch
30 verändern. So kann beispielsweise das Expressionsprofil einer Zelle innerhalb weniger Minuten beeinflußt werden. Verständlicherweise kann in solchen Fällen nicht ausgeschlossen werden, daß die so erhaltenen Analyseergebnisse Scheineigenschaften widerspiegeln, welche die disseminierten
35 Krebszellen in der Körperflüssigkeit vor ihrer Isolierung nicht aufwiesen. Dies wäre aber wünschenswert. Ferner ist von Nachteil, daß die anhaftenden Antikörper nicht oder nur mit ungünstigen Auswirkungen auf die Zelle entfernt werden können.

Richten sich die Antikörper gegen intrazelluläre Bestandteile, ist sogar eine Fixierung und Perforierung der Zelle erforderlich, was deren Tod zur Folge hat. Unter derartigen Umständen sind sogenannte Bioassays, die mit lebenden und insbesondere vermehrungsfähigen Zellen arbeiten, mit großen Schwierigkeiten behaftet oder gar unmöglich. Ein weiterer Nachteil der Aufreinigung über Antikörper liegt in der Kreuzreaktivität bestimmter Epitope, so daß auch "normale" Zellen mitisoliert werden können. Außerdem können durch Clusterbildung mit Blutbestandteilen, z.B. Blutplättchen, Fibrinen und ähnlichem, isolationstechnisch wichtige Epitope zumindest teilweise verdeckt werden, so daß eine Isolierung solcher Zellen

Die Anforderungen, die an ein Verfahren zur Isolierung von Krebszellen im Rahmen der Identifizierung und Charakterisierung disseminierter Krebszellen gestellt werden müssen, sind hoch. Neben der üblicherweise im Hinblick auf das Verfahrensprodukt geforderten hohen Ausbeute und Reinheit, ist es im vorliegenden Fall vor allem die Authentizität der isolierten Krebszellen, welche die Brauchbarkeit eines derartigen Isolierungsverfahrens bestimmt. Die Krebszellen sollten möglichst unverändert aus der Körperflüssigkeit isoliert werden können, also nicht mit isolationstechnisch bedingten Konstrukten, wie Glasbeads behaftet sein. Sie sollten ex vivo kultiviert werden können und in Bio-Assays ein zuverlässiges Bild ihres ursprünglichen Zustandes in der Körperflüssigkeit wiedergeben.

Ein Verfahren, das diesen Anforderungen gerecht wird, nutzt die entscheidenden Vorteile aus, die sich aus der Identifizierung und vor allem Charakterisierung von Krebszellen aus Körperflüssigkeiten ergeben. Vergleicht man Zellen aus Primärtumorgewebe mit entsprechenden disseminierten Tumorzellen, so weisen die disseminierten Tumorzellen in der Regel genetische und physiologische Merkmale auf, die sich von denen des Primärtumors unterscheiden, beispielsweise durch klonale Selektion aus diesen entstehen können. Diese Merkmale liefern wichtige, gegebenenfalls zusätzliche Informationen für

die Diagnose, Prognose, Prädiktion und weitere onkologische Fragestellungen.

5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein schonendes Verfahren zur Isolierung von Krebszellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten zur Verfügung zu stellen, das den Zustand dieser Krebszellen nicht oder nur unwesentlich beeinflusst.

10 Überraschenderweise wurde gefunden, daß es gelingt, Krebszellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten durch einen größen- und/oder gestaltabhängigen Trennvorgang zu isolieren.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Isolierung von Krebszellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die zellhaltige Körperflüssigkeit oder Teile davon durch ein Sieb führt, das Krebszellen zurückhält.

20 Unter Isolierung versteht man erfindungsgemäß jegliche Anreicherung eines zu isolierenden Bestandteils aus einem Gemisch, das diesen neben wenigstens einem anderen Bestandteil enthält. Das Ergebnis der Isolierung kann also durchaus auch ein weiteres Gemisch sein, das aber im Vergleich zum ursprünglichen Gemisch den zu isolierenden Bestandteil im
25 Verhältnis zu wenigstens einem anderen Bestandteil in höherer Konzentration enthält.

30 Der Begriff Krebszelle steht erfindungsgemäß für eine Zelle, die eine oder mehrere mit Krebs, also Entartung im allgemeinen Sinn, in Zusammenhang stehende Modifikation aufweist. Grundlage dieser Definition ist die Vorstellung, daß es sich bei der Entstehung von Krebs um einen kontinuierlichen Veränderungsprozeß handelt. Beispielsweise bedarf es in der Regel mehrerer Veränderungen insbesondere des genetischen
35 Materials bzw. der Expression des genetischen Materials von Zellen auf dem Weg von einer Normalzelle zu einer Krebs- und insbesondere einer Tumorzelle. Der Begriff Krebszelle umfaßt daher auch Vorstufen von Krebs- und insbesondere Tumorzellen

mit krebsartigen bzw. tumorösen Modifikationen. Disseminierte Tumorzellen, also Zellen, die sich vom Primärtumor abgelöst haben und in Körperflüssigkeiten zirkulieren, gelten nicht als eigentlicher Tumor im medizinischen Sinn, sie stellen aber Krebszellen im erfindungsgemäßen Sinn dar. Erfindungsgemäß gehören zu disseminierten Tumorzellen auch mikrometastasierte und metastasierende Tumorzellen, sofern sich diese in einer erfindungsgemäßen Körperflüssigkeit befinden.

10 Unter Sieb versteht man erfindungsgemäß ein Material, das einen größen- und/oder gestaltabhängigen, d.h. auf Zellgröße, Verformbarkeit, Aggregat- oder Clusterbildung basierenden, Trennvorgang ermöglicht. In Bezug auf die Isolierung von Krebszellen versteht man unter Sieb also ein Trennmittel, mit
15 dem sich Krebszellen von Nichtkrebszellen trennen lassen. Der Siebvorgang führt zu einer räumlichen Aufteilung von Krebszellen und Nichtkrebszellen; zur Bildung von wenigstens zwei Zellfraktionen; zur bevorzugten Zuordnung von Krebszellen zu wenigstens einer Zellfraktion und zur bevorzugten Zuordnung
20 von Nichtkrebszellen zu wenigstens einer weiteren Zellfraktion; gegebenenfalls zur im wesentlichen ausschließlichen Zuordnung von Krebszellen zu wenigstens einer Zellfraktion.

In der Regel findet man im Siebrückstand - je nach
25 Krebszellgehalt der Körperflüssigkeit - bis zu 100 Krebszellen pro ml Körperflüssigkeit. Im Vergleich zu den in der Körperflüssigkeit vorhandenen Nichtkrebszellen - im Falle von Blut insbesondere den mononukleären Zellen - erreicht man in der Regel Anreicherungs-faktoren von 10^5 und höher, vorzugsweise
30 von mindestens 5×10^5 , bevorzugter von mindestens 10^6 und insbesondere von wenigstens 5×10^6 . Diese Faktoren lassen sich gegebenenfalls durch weitere dem Siebvorgang vor- und/oder nachgeschaltete Trennvorgänge erhöhen. So werden bei der
üblicherweise an Blut zunächst vorgenommenen Abtrennung der
35 MNC-Fraktion, z.B. durch Dichtegradientenzentrifugation, Anreicherungs-faktoren von etwa 10^2 erreicht.

Im Hinblick auf die anschließende Verwendung der Krebszellen können an das Verhältnis von Krebszellen zu Nichtkrebszellen
40 unterschiedlich hohe Anforderungen gestellt sein. Sensitive Untersuchungsmethoden, wie die p53-Analytik, erfordern

beispielsweise ein Verhältnis von wenigstens einer Krebszelle zu 1000 Nichtkrebszellen während weniger sensitive Untersuchungsmethoden, wie die LOH-Analytik, ein Verhältnis von wenigstens 1:1 erfordern.

5

Erfindungsgemäß kann man ein Sieb wählen, das Nichtkrebszellen der zellhaltigen Körperflüssigkeit gerade noch passieren läßt. Ebenfalls geeignet ist ein Sieb, das auch größere Partikel als Nichtkrebszellen passieren läßt, Krebszellen oder wenigstens
10 ein Teil der Krebszellen hingegen zurückhält. Unter Berücksichtigung eines größen- und/oder gestaltabhängigen Trennvorgangs kann die Wahl des Siebes, insbesondere in Abhängigkeit von der verwendeten Körperflüssigkeit, optimiert werden.

15

Bei dem Sieb handelt es sich in der Regel um ein flächiges Gebilde mit Öffnungen, die auch als Maschen bezeichnet werden. Neben flächigen Materialien sind auch poröse Körper, beispielsweise Filter, oder membranartige Materialien geeignet.
20 Voraussetzung ist allerdings, daß die Porengröße hinreichend definiert ist.

25

Die Größen der Öffnungen eines Siebes liegen in der Regel innerhalb eines bestimmten Bereichs. Die Angabe von Unter- und Obergrenze bedeutet nicht, daß auch Öffnungen mit genau diesen Grenzwerten auf dem Sieb vorhanden sein müssen. Wohl aber bedeutet eine solche Angabe, daß Öffnungen, deren Größe diese Werte unter- bzw. überschreitet, auf dem Sieb nicht vorhanden sind. Vorzugsweise liegen die Größen der Öffnungen eines Siebes
30 innerhalb eines eng definierten Bereichs. Idealerweise sind sie im wesentlichen einheitlich. Die Größen der Öffnungen eines Siebes werden im folgenden als Maschenweite oder Porengröße/Porenweite bezeichnet.

35

Ein erfindungsgemäß einsetzbares Sieb weist in der Regel eine Maschenweite bzw. Porenweite von 10, insbesondere 15, bis 200 μm , vorzugsweise von 15, insbesondere 17, bis 30 μm und besonders bevorzugt von etwa 20 μm auf. Gemeint sind sowohl Siebe, deren Maschen- bzw. Porenweite eine gewisse Verteilung
40 innerhalb der vorstehend genannten Bereiche aufweist, als auch Siebe mit einer im wesentlichen einheitlichen Maschen- bzw.

Porenweite, deren Wert innerhalb der vorstehend genannten Bereiche liegt.

Siebe mit gleichmäßiger Maschen- bzw. Porenweite erlauben
5 Angaben zum absoluten Rückhaltervermögen, d.h. der Größe der
gerade noch passierbaren Partikel. Siebe mit unregelmäßiger
Poren- bzw. Maschenweite hingegen gestatten lediglich die
Angabe von nominalen Rückhaltevermögen, wonach 98% aller
Partikel, die größer als dieses nominale Rückhaltevermögen
10 sind, zurückgehalten werden.

Erfindungsgemäß einsetzbare Siebe weisen in der Regel ein
absolutes bzw. nominales Rückhaltevermögen von 10, insbesondere
15 15, bis 200 μm , vorzugsweise von 15, insbesondere 17, bis 30 μm
und insbesondere von etwa 20 μm auf.

Die Wahl des Materials für die sowohl flächige Gebilde, wie
Sieb- oder Membranfilter, als auch poröse Körper wie
Tiefenfilter umfassenden erfindungsgemäßen Siebe ist von
20 untergeordneter Bedeutung. Zu nennen sind vor allem
faserbildende Materialien, insbesondere organische Polymere
oder anorganische Fasern, und Bildner mikroporöser Matrices
organischen oder anorganischen Ursprungs. Beispielsweise können
Harze, Gele, Granulate, sinterfähige Materialien, Glase,
25 Keramiken, Molekularsiebe, z.B. Zeolithe, etc. verwendet
werden. Organische Polymere können natürlichen, d.h. tierischen
oder pflanzlichen Ursprungs, halbsynthetisch oder
vollsynthetisch sein. Zu nennen sind beispielsweise
keratinhaltige Strukturen, Haare, z.B. Kamelhaar, Wolle,
30 Angora, Seide, cellulosehaltige Strukturen, Baumwolle, Flachs,
Hanf, Jute etc. Erwähnenswert sind halbsynthetische Polymere
auf Cellulosebasis, beispielsweise Celluloseester, insbesondere
Celluloseacetat und Nitrocellulose, sowie gemischte
Celluloseester. Zu brauchbaren vollsynthetischen Polymeren
35 gehören Polyolefine, wie Polyethylen (PE), Polypropylen (PP),
Cyclopolyolefine, Polyamide, wie Nylon (GRILON, GRILAMID),
Nylon 6, Nylon 6,6, Nylon 11, Nylon 12, Copolymamide (GRILON
C), Aramide, Poly(p-phenylentheraphthalamid) (KEVLAR),
Polyester, wie Poly(alkylentheraphthalat), insbesondere
40 Poly(ethylentheraphthalat) (PETP), Acrylpolymere, wie
Polyacrylonitril (DRALON) und Acrylate, Vinylpolymere, wie

- Poly(vinylchlorid) (PVC), Poly(vinylalkohole), Polyesterether, wie Polyetheretherketon (PEEK), Polyurethane, Epoxide, Fluorkohlenstoffpolymere, wie Poly(vinylidenfluorid) (PVDF), Poly(tetrafluorethylen) (PTFE, TEFLON),
- 5 Polyhexafluorethylenpropylen-Copolymer (FEP), Polyethylentetrafluorethylen-Copolymer (ETFE, AFLON), Polyethylenchlortrifluorethylen-Copolymer (ECTFE, HALAR), Polycarbonate, wie PCTE, Polyphenylensulfide (PPS), Polyethersulfone, etc. Glase, insbesondere Borosilikate und
- 10 Siliciumdioxide, Silicium, Metalle, Keramiken, Kohlenstoff und Asbest sind beispielsweise als anorganische Faserbildner zu nennen. Auch Gemische aus den vorstehend genannten Materialien können verwendet werden. Erforderlichenfalls können die Materialien, insbesondere die aus ihnen bestehenden Fasern,
- 15 modifiziert, beispielsweise metallisiert, hydrophobiert, hydrophiliert, z.B. mit Polyvinylpyrrolidon, mit Stützstrukturen versehen, vernetzt, oder mit Bindemitteln, z.B. Acrylaten oder Melaminharzen, umgeben sein.
- 20 Siebe aus lösungsmittelbeständigem Material sind für bestimmte Ausführungsformen der Erfindung von Vorteil. Bevorzugt werden lösungsmittelbeständige Kunststoffe, wie Polypropylen, Polytetrafluorethylen, hochfluorierte Polymere, Vinylidenfluorid, Aminoplaste, insbesondere Polyethylen. Auch
- 25 Metalle, Gläser und andere mineralische Werkstoffe sowie bestimmte Naturfasern sind grundsätzlich geeignet.

Die Herstellung derartiger Siebe liegt im Bereich fachmännischen Könnens, z.B. können Webverfahren, Ätzverfahren,

30 sowohl trocken als auch naßchemisch, die Laserstrukturierung, z.B. RMPD-Maskentechnik, photolithographische Verfahren, LIGA, etc. eingesetzt werden.

Faserbildende Materialien können verschiedene Faserstrukturen

35 aufweisen. Zu nennen sind beispielsweise glatte, kantige, wellige, zerfranste, fasrige und ähnliche Oberflächenformen; kreisrunde, elliptische, knochenartige, gezackte, geplappte und ähnliche Querschnittsformen; geradelinige, gekrümmte, helikale

und ähnliche Axialformen (Textur); bei mehr als einer Komponente unterschiedliche Querschnittsverteilungen, z.B. bei Bikomponentfasern Anordnungen der beiden Komponenten Seite-an-Seite, als Ummantelung, Beschichtung, Kern-Schale-Typ oder
5 Mehrkernanordnungen ("Inseln-im-Meer").

Vorzugsweise handelt es sich um Gewebe aus Fäden, Fasern, Filamenten oder Bündeln davon mit Öffnungen verschiedenster Geometrie. Mono- und/oder multifilament Fasern können
10 verwendet werden. Mögliche Webstrukturen sind nicht zuletzt aus dem Textilbereich bekannt. Vorteilhaft sind Webstrukturen, bei denen der prozentuale Anteil der offenen Fläche (Gesamtfläche sämtlicher Öffnungen) einen problemlosen Siebvorgang ermöglicht. 1:1- und 2:1-Strukturen werden in der Regel
15 bevorzugt. Auch für die Oberfläche der Fäden, Fasern, Filamente oder Bündel kommen verschiedene Ausführungen in Frage. So kann die Oberfläche gleichmäßig oder ungleichmäßig, beispielsweise glatt, kantig, wellig, zerfrant oder haarig sein. Ferner sind auch perforierte Platten geeignet, wobei ebenfalls Öffnungen
20 verschiedenster Geometrie und Anordnung möglich sind.

Das Sieb kann ein- oder mehrschichtig sein. Für bestimmte erfindungsgemäße Ausführungsformen werden einschichtige Siebe bevorzugt. Es können auch mehrere, ggf. unterschiedliche Siebe
25 hintereinander angeordnet werden.

Zweckmäßigerweise ist das Sieb in einer Vorrichtung angeordnet, die es gestattet, die zellhaltige Flüssigkeit durch das Sieb zu führen und den Siebdurchgang aufzufangen. Das Sieb sollte
30 dieser Vorrichtung auch entnommen werden können, um zusammen mit dem Siebrückstand weiteren Verfahrensschritten zugeführt werden zu können. Falls erforderlich, können auch Mittel zum Anlegen von Druck oder Unterdruck vorgesehen sein, um den Siebvorgang zu erleichtern. Geht dem Siebvorgang eine
35 vorbereitende Aufarbeitung der zellhaltigen Körperflüssigkeit voraus, so kann es zweckmäßig sein, Vorrichtungen und Mittel zur Durchführung des Siebvorganges an Vorrichtungen und Mittel zur Durchführung der Aufarbeitung zu koppeln, wobei der

Siebvorgang der Aufarbeitung nachgeschaltet wird. Darüber hinaus kann der Fachmann weitere Maßnahmen vorsehen, um den üblicherweise im Bereich der Biochemie und Molekularbiologie gestellten Anforderungen, wie Temperatur und Sterilität, zu genügen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auf all diejenigen zellhaltigen Körperflüssigkeiten angewendet werden, die Krebszellen und insbesondere disseminierte und mikrometastasierte Krebszellen aufweisen. Dies sind sowohl native Körperflüssigkeiten, die dem Körper entnommen werden oder von diesem ausgeschieden werden, als auch nichtnative Flüssigkeiten, insbesondere Waschflüssigkeiten, die Zellen aus dem Körper und insbesondere bestimmten Körperteilen und Organen enthalten. Man z.B. kann die Flüssigkeit in geeigneter Weise dem Körper zunächst zuführen und dann wieder entnehmen. Auch können native mit nichtnativen Flüssigkeiten versetzt sein. Zu nennen sind beispielsweise Lymphe, Urin, Sputum, Ascites, Ergüsse, Fruchtwasser, Punkate, Waschflüssigkeiten von Organen, z.B. Colon-, Lungen-, Bronchiallavage oder Blasenspülflüssigkeit, Fäces, und insbesondere Knochenmark und Blut. Es kann sich um Körperflüssigkeiten verschiedener Species handeln, beispielsweise von Säugern, insbesondere Menschen, Labor- und Versuchstieren, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen, etc. Derartige Körperflüssigkeiten können dem Siebvorgang direkt zugeführt werden. Vielfach ist es allerdings von Vorteil, die zellhaltige Körperflüssigkeit zunächst einer vorbereitenden Aufarbeitung zu unterziehen. So kann man beispielsweise zelluläre von nicht-zellulären Bestandteilen trennen. Auch die zellulären Bestandteile können gegebenenfalls noch weiter aufgetrennt werden, indem man beispielsweise eine zellhaltige Fraktion isoliert, in der bekanntermaßen Krebszellen mitenthalten sind. Zu diesem Zweck bieten sich vor allem die eingangs beschriebenen physikalischen Trennverfahren, wie die Dichtegradientenzentrifugation, an.

Werden Krebszellen aus Blut isoliert, ist es erfindungsgemäß bevorzugt, zunächst Zellen des weißen Blutbildes durch

Dichtegradientenzentrifugation abzutrennen. Krebszellen findet man vor allem in der Fraktion, die auch mononukleäre Zellen enthält, so daß diese Fraktion bevorzugt dem anschließenden Siebvorgang zugeführt wird.

5

Weiterhin ist es auch möglich, die Krebszellen in der Zellsuspension vor dem Siebvorgang zu verändern, beispielsweise zu markieren, Partikel anzuhängen, eine Aggregation und/oder Clusterbildung auszulösen, z.B. durch geeignete Antikörper, Enzyme, Lectine, andere Liganden und/oder Rezeptoren oder kreuzvernetzende Reagenzien, zu fixieren und andere definierte Zustände zu induzieren.

10

Um dem Siebvorgang zugeführt werden zu können, sollten die zuvor aus einer Körperflüssigkeit isolierten zellhaltigen Fraktionen (Isolate) in Suspension vorliegen. Als Suspensionsmedium wählt man vorteilhafterweise einen Puffer oder ein Kulturmedium. Das Suspensionsmedium sollte möglichst keine Auswirkungen auf die interessierenden Eigenschaften der Zellen haben.

15

20

Bevor man die zellhaltige Körperflüssigkeit oder Isolate davon durch ein Sieb führt, ist es für die spätere Auswertung von Vorteil, Aliquots an zellhaltiger Flüssigkeit abzunehmen.

25

Derartige Proben können als Bezugsgröße für die an Siebrückstand und Siebdurchlauf ermittelten Meßwerte dienen. Dies erlaubt einen Abgleich gegen Nichtkrebszellen, z.B. als CD-45-positive Zellen isolierte Lymphozyten als Patienten-eigene interne Kontrolle, wodurch Analysen an den isolierten Krebszellen mit besonderer Sensitivität durchgeführt werden können.

30

Der Siebvorgang ist beendet, wenn die gesamte zellhaltige Flüssigkeit das Sieb passiert hat. Es kann sich ein Waschvorgang anschließen, bei dem weitere Flüssigkeit, vorzugsweise Puffer oder Kulturmedium, durch das Sieb geführt wird. Die Waschflüssigkeit kann zu dem zuvor gewonnenen Siebdurchlauf gegeben oder auch getrennt davon gesammelt und gegebenenfalls verworfen werden.

35

Die auf dem Sieb zurückgehaltene Zellfraktion kann direkt der sich anschließenden Verwendung, beispielsweise der Charakterisierung der Zellen, insbesondere der Krebszellen, oder der Aufbewahrung zugeführt werden. Vorteilhafterweise werden die Zellen, insbesondere die Krebszellen, allerdings zunächst vom Sieb abgelöst. Je nach Art der anschließenden Verwendung kann man zu diesem Zweck verschiedene Vorgehensweisen wählen.

- 10 Eine Möglichkeit besteht darin, die auf dem Sieb zurückgehaltenen Zellen, insbesondere die Krebszellen, abzuwaschen, indem man eine geeignete Flüssigkeit in entgegengesetzter Richtung durch das Sieb führt und die zellhaltige Waschflüssigkeit gewinnt. Die abgelösten Zellen
15 können dann gewünschtenfalls aus der Zellsuspension pelletiert werden.

- Auch ist es möglich, die am Sieb anhaftenden Zellen, insbesondere die Krebszellen, unter Krafteinwirkung abzulösen.
20 Schwerkraft, Zentrifugalkraft und elektrische Kräfte können eingesetzt werden. Sedimentation, Zentrifugation, Elektrophorese, Dielektrophorese, Verwendung einer sogenannten optischen Pinzette, Elektroosmose, und ähnliche Verfahren sind dem Fachmann zu diesem Zweck geläufig. Dies gelingt
25 beispielsweise, indem man das Sieb so in ein geeignetes Medium, in der Regel eine Flüssigkeit gibt, daß die Zellen durch Zentrifugation pelletiert werden können. Auf diese Weise können die Zellen direkt in ein Medium überführt werden, das für die nachfolgende Verwendung geeignet ist.

- 30 Eine weitere Möglichkeit, die auch zum Ablösen der Zellen, insbesondere der Krebszellen, vom Sieb führt, durch die diese Zellen allerdings gleichzeitig zerstört werden, besteht darin, das Sieb samt anhaftender Zellen den der Gewinnung von
35 Zellbestandteilen, z.B. Nukleinsäuren und Proteinen, dienenden Verfahren zuzuführen. Sofern derartige Maßnahmen den Einsatz organischer Lösungsmittel erfordern, beispielsweise die in diesem Bereich vielfach zur Isolierung von Gesamt-RNA, DNA und

Proteinen verwendeten Guanidinisothiocyanat und Phenol enthaltenden Lösungen, benutzt werden, sind Siebe aus lösungsmittelbeständigen Materialien bevorzugt.

5 Das erfindungsgemäße Verfahren führt zur Isolierung von Krebszellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten. Unter Isolierung von Krebszellen im erfindungsgemäßen Sinne versteht man die Herstellung von Krebszellen enthaltenden Zellgemischen aus Körperflüssigkeiten, wobei das Verhältnis von Krebszellen
10 zu Nichtkrebszellen in den hergestellten Zellgemischen größer ist als in den ursprünglichen zellhaltigen Körperflüssigkeiten. So bedeutet Isolierung die Anreicherung von Krebszellen in zellhaltigen Fraktionen von Körperflüssigkeiten. Es werden zellhaltige Fraktionen mit erhöhtem Krebszellanteil hergestellt
15 und gewonnen.

Vorzugsweise handelt es sich bei den zellhaltigen Fraktionen um Zellgemische mit einem Krebszellanteil von wenigstens 50%, bevorzugter von wenigstens 80% und insbesondere von wenigstens
20 90%.

Isolierung im erfindungsgemäßen Sinn bedeutet auch die Gewinnung von Krebszellen, die im wesentlichen frei von Nichtkrebszellen sind. Diese können in Form von
25 Krebszellgemischen gewonnen werden, die in der Regel polyklonal sind, durchaus aber auch gemeinsame Merkmale aufweisen können. Es können allerdings auch Fraktionen dieser Krebszellgemische und auch Einzelzellen gewonnen werden, die (weitere) gemeinsame Merkmale aufweisen und/oder gegebenenfalls sogar monoklonal
30 sind. Dies bedarf unter Umständen einer Subtypisierung der erfindungsgemäß aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten isolierten, d.h. angereicherten Krebszellen, anhand von Stratifizierungsparametern (z.B. immunologisch) und/oder einer weiteren Aufreinigung. Zu nennen sind hier beispielsweise die
35 Laser-Mikrodissektion, Mikromanipulation, Dielektrophorese, Elektroosmose, Optische Pinzette, FACS und ähnliches nach spezifischer Adressierung.

Isolierung im erfindungsgemäßen Sinne bedeutet auch ein Abtrennen von Krebszellen aus zellhaltigen Präparaten, insbesondere Körperflüssigkeiten oder Teilen davon, d.h. eine Reduktion des Krebszellanteils in zellhaltigen Präparaten, beispielsweise aus Blut oder Blutbestandteilen, vorzugsweise extrakorporal, aus Stammzellpräparaten oder sonstigen Reinfusions-, Transfusions- und Transplantationspräparaten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann somit auch zur, gegebenenfalls vollständigen, Entnahme kontaminierender Krebszellen aus Zellgemischen, d.h. zellhaltigen Präparaten, insbesondere Körperflüssigkeiten oder aus Isolaten davon, angewendet werden (Depletion).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit auch Verfahren zur Entnahme, insbesondere zur extrakorporalen Elimination, von Krebszellen, insbesondere von Tumorzellen, aus zellhaltigen Präparaten, insbesondere Körperflüssigkeiten oder Teilen davon, und auch Verfahren zur Depletion von Stammzellpräparaten oder sonstiger Reinfusions- und/oder Transfusionspräparaten zur Reduktion des Krebszellgehaltes. Zweck dieser Verfahren ist insbesondere die Rezidivprophylaxe. So stellen disseminierte Tumorzellen in Körperflüssigkeiten und anderen Zellpräparaten einen erheblichen Risikofaktor für die Entwicklung von Rezidiven bzw. Metastasen dar. Die Konzentration und die Zusammensetzung der Zellen beeinflusst - neben ihrer genetischen Disposition - die Wahrscheinlichkeit, mit der sich Metastasen entwickeln. Die Verringerung der Konzentration an Krebszellen, insbesondere von disseminierten Tumorzellen, in diesen Körperflüssigkeiten durch ein Verfahren, mit dem diese extrakorporal entfernt werden, reduziert die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv. Beispielsweise erhalten viele Tumorpatienten nach Bestrahlung und/oder Chemotherapie autologe Zellisolate. Diese Zellen, beispielsweise Apherese-Produkte, isolierte Stammzellen und dergleichen, können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren auf schonende Weise von Krebszellen befreit werden. Das Risiko eines Rezidivs durch kontaminierende Krebszellen kann so reduziert werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder nicht-menschlichen tierischen Körpers mit dem therapeutischen Ziel der Rezidivprophylaxe.

5

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch der verfahrensgemäß gewonnene Siebrückstand sowie daraus erforderlichenfalls unter Verwendung weiterer an sich bekannter Maßnahmen abgeleitete Fraktionen, insbesondere Zellgemische, Krebszellgemische, Krebszellklone und/oder Krebszellbestandteile. Gegenstand sind also auch aus Körperflüssigkeiten mit einem der vorstehend beschriebenen Verfahren erhältliche - umfassend als Krebszellmaterial bezeichnete - Zellgemische, Krebszellgemische, Krebszellklone, daraus etablierte Zelllinien und/oder Krebszellbestandteile.

10

15

Bevorzugt sind aus Körperflüssigkeiten abgeleitete Zellgemische mit einem Krebszellanteil von wenigstens 50%, vorzugsweise von wenigstens 80% und insbesondere von wenigstens 90%. Bei dem jeweiligen Restanteil kann es sich um Nichtkrebszellen aus der betreffenden Körperflüssigkeit handeln.

20

Besonders bevorzugt sind aus Körperflüssigkeiten abgeleitete Krebszellgemische, die nur geringe Mengen und vorzugsweise keine Nichtkrebszellen enthalten. Diese Gemische sind in der Regel polyklonal. Obwohl polyklonal, so können sie doch im Hinblick auf wenigstens ein Merkmal, beispielsweise einer bestimmten genomischen Disposition oder eines

25

Expressionsparameters, homogen sein. Bevorzugt werden

Krebszellgemische, die in Bezug auf wenigstens 1, 2, 3, 4, 5, 10 oder 15 analytisch zu bestimmende Parameter im wesentlichen homogen sind. Zu diesen Bestimmungen zählen krebsnachweisende Analysen, tumorbiologisch relevante Analysen zur Messung zellphysiologischer Parameter, Analysen pharmakologisch relevanter Parameter, Bioassays, cytologische Analysen, und ähnliche Verfahren, auf die nachfolgend noch näher eingegangen wird.

30

35

Insbesondere bevorzugt sind Krebszellklone, d.h. einzelne Krebszellen oder monoklonale Krebszelllinien.

Ausgehend von den vorstehend beschriebenen Zellgemischen, Krebszellgemischen und Krebszellklonen, vor allem aus den Krebszellgemischen und insbesondere den Krebszellklonen, können Zelllinien etabliert werden. Es kann sich sowohl um Kurzzeit- als auch Langzeit-Zelllinien handeln. Diese Zelllinien können in fachmännischer Weise etabliert werden, eine geeignete Methodik, beispielsweise im Hinblick auf die Wahl des Kulturmediums oder der Kulturbedingungen sowie der Aufbewahrung bzw. Konservierung, sind dem einschlägigen Fachmann bekannt. Gegebenenfalls kann auf Kenntnisse zu bereits etablierten Krebszelllinien, wie HeLa, zurückgegriffen werden.

Zu den Zellbestandteile, die aus den vorstehend beschriebenen zellhaltigen Präparaten abgeleitet sind, zählen beispielsweise Zellysate sowie Fraktionen davon, also bestimmte Zellbestandteile, wie Nukleinsäuren, Proteine, etc., die in fachmännischer Weise aus den zuvor gewonnenen zellhaltigen Präparaten isoliert werden.

Erfindungsgemäß gelingt es, aus Körperflüssigkeiten isolierte Krebszellen zur Verfügung zu stellen, die frei vom verwendeten Trennmittel sind. Sie sind also insbesondere frei von herkömmlicherweise zu Isolationszwecken verwendeten Liganden, wie Antikörpern, Lektinen, etc. Die erfindungsgemäßen Krebszellen befinden sich daher in einem biologischen Zustand und nicht in einem künstlichen Zustand, wie er üblicherweise im Zuge ihrer Isolierung, z.B. durch Fixierung und/oder Markierung, herbeigeführt wird. Ein biologischer Zustand im erfindungsgemäßen Sinne ist daher ein Zustand, den die betreffende Zelle insbesondere im Hinblick auf Physiologie, Morphologie und/oder Expressionsprofil in einer Körperflüssigkeit eines menschlichen oder nicht-menschlichen tierischen Individuums annehmen kann. Zur Beschreibung dieses biologischen Zustandes sind vor allem Parameter in Bezug auf Zellzyklus, Aktivierung, Proliferation, Apoptose und ähnliches

von Bedeutung. Diese werden durch den erfindungsgemäßen Isolationsvorgang im wesentlichen nicht verändert. Ein biologischer Zustand kann somit durch eine oder mehrere der nachfolgend beispielhaft genannten Eigenschaften gekennzeichnet
5 sein: vital, teilungsfähig, proliferativ, kultivierbar, präapoptotisch, apoptotisch, tot, vereinzelt, aggregiert, clusterbildend, etc.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher auch aus
10 Körperflüssigkeiten isolierte - ebenfalls unter den erfindungsgemäßen Begriff Krebszellmaterial zu fassende - Krebszellen, insbesondere disseminierte Tumorzellen, deren Zustand biologisch, vorzugsweise vital, ist, gegebenenfalls im Gemisch mit Nichtkrebszellen, sowie daraus etablierte
15 Zelllinien. Isoliert bedeutet in diesem Zusammenhang, daß das Verhältnis von Krebszellen zu Nichtkrebszellen größer ist als in der ursprünglichen Körperflüssigkeit. Bevorzugt ist ein Krebszellanteil von wenigstens 50%, vorzugsweise von wenigstens 80% und insbesondere von wenigstens 90%. Ganz besonders
20 bevorzugt sind im wesentlichen reine Krebszellen, die in vorteilhafter Ausgestaltung die Merkmale der vorstehend beschriebenen Krebszellgemische, Krebszellklone und der daraus etablierten Zelllinien aufweisen.

25 Einen besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung bilden erfindungsgemäße Krebszellen, die durch eine in quantitativer und/oder qualitativer Hinsicht bestimmte Kombination von Parametern (Muster) gekennzeichnet sind. Die musterbildenden Parameter betreffen vor allem genomische Dispositionen und/oder
30 Expressionsprofile. Besondere Krebszellen ergeben sich beispielsweise unter Bezugnahme auf die in der WO 99/10528 offenbarten Kombinationen bestimmter Gene zur Vornahme von Multiparameter-Expressionsanalysen sowie genomischer Untersuchungen auf Onkogene und/oder mutierte
35 Tumorsuppressorgene. Zu nennen sind also beispielsweise Krebszellen, die CEA und CK20, gegebenenfalls in Kombination mit tumorspezifischen Splice-Varianten des MUC1-Gens; oder MAGE3 und Tyrosinase gegebenenfalls in Kombination mit Muc18

exprimieren; und/oder Krebszellen mit wenigstens zwei der unter p53-Mutationen und/oder -LOH's, erb-B2-Amplifikationen, c-myc-Amplifikationen und K-ras-Mutationen ausgewählten genomischen Dispositionen gegebenenfalls in Kombination mit LOH's der Gene RB, APC, DCC und/oder DPC4; und/oder Krebszellen, die Maspin und/oder den Progesteron-Rezeptor, gegebenenfalls in Kombination mit β -hCG, dem Östrogenrezeptor und/oder SCCA; PSM und/oder PSA gegebenenfalls in Kombination mit hK2; Gastrin gegebenenfalls in Kombination mit GIP und/oder Motilin; oder SP-A und SP-C gegebenenfalls in Kombination mit β -hCG exprimieren; und/oder bFGF, bFGF-R, VEGF-R1 und/oder VEGF-R2 gegebenenfalls in Kombination mit VEGF; MMP's, insbesondere MMP2; und/oder TIMP's, insbesondere TIMP3 exprimieren; und/oder FAS-L und FAS-R; gegebenenfalls Cycline, insbesondere Cyclin B, D und E in zellzyklusspezifischen Verhältnissen, Ki67, bax und/oder bcl-2 exprimieren. Mit Expression kann eine qualitative Expression und auch eine im Vergleich zu Nichtkrebszellen quantitativ erhöhte oder verminderte Expression gemeint sein. Die vorstehend beschriebenen Muster können auch die aus den Krebszellen etablierten Zelllinien und abgeleitete Zellbestandteile kennzeichnen.

Natürlich können an den isolierten Krebszellen gezielte Eingriffe vorgenommen werden, die den biologischen Zustand in einen künstlichen Zustand überführen, beispielsweise indem man sie fixiert, markiert, beispielsweise radioaktiv, mit PET-Labeln, NMR-Sonden, etc., oder einen anderen Zustand induziert, der durchaus auch einem biologischen Zustand entsprechen kann.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher auch aus Körperflüssigkeiten isolierte - ebenfalls unter den erfindungsgemäßen Begriff Krebszellmaterial zu fassende - Krebszellen, insbesondere disseminierte Tumorzellen, deren Zustand ein nach Isolierung ausgehend von einem biologischen Zustand induzierter künstlicher Zustand ist, gegebenenfalls im Gemisch mit Nichtkrebszellen, sowie daraus etablierte Zelllinien. Bevorzugte Ausgestaltungen dieses Gegenstandes ergeben sich in Analogie zu den vorstehend beschriebenen

Ausgestaltungen von erfindungsgemäßen Krebszellen mit biologischem Zustand.

Auch Zellbestandteile der erfindungsgemäßen Krebszellen, z.B. Lysate oder Fraktionen davon, zeichnen sich in ihrer Struktur und/oder Zusammensetzung dahingehend aus, daß sie sich von den erfindungsgemäßen Zellbestandteilen ableiten.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher auch - ebenfalls unter den erfindungsgemäßen Begriff Krebszellmaterial zu fassende - Zellbestandteile, die aus den erfindungsgemäßen Krebszellen mit biologischem oder induziertem künstlichen Zustand abgeleitet sind. Diese Zellbestandteile können aus den entsprechenden Zellen in an sich bekannter Weise hergestellt werden.

Das erfindungsgemäße Krebszellmaterial kann in Form von Stoffbanken, z.B. Zellbanken oder Biorepositorien, angelegt sein. Eine zweckmäßige Aufbewahrung liegt im Bereich fachmännischen Könnens unter Berücksichtigung des aufzubewahrenden Materials. Für lebendes und/oder empfindliches Material eignet sich insbesondere die Kryokonservierung, z.B. unter Stickstoff. In dieser Form kann das Krebszellmaterial zur gewerblichen Nutzung im Hinblick auf weitere Verwendungen hergerichtet sein. Zellbestandteile hingegen können unter Umständen als Chemikalie - je nach Empfindlichkeit auch bei höheren Temperaturen, gegebenenfalls unter Trockeneis- oder Eiskühlung oder sogar bei Raumtemperatur in zweckmäßiger Verpackung - gehandelt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Mittel, beispielsweise pharmazeutische oder tierarzneiliche Mittel zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung am Menschen oder an nicht-menschlichen tierischen Wesen, die - neben weiteren zweckmäßigen, fachmännisch auszuwählenden Komponenten, insbesondere Formulierungshilfen zur Verabfolgung, weiteren Wirkstoffen und/oder Komponenten eines diagnostischen Tests, erfindungsgemäßes Krebszellmaterial enthalten. Diese Mittel

umfassen somit aus Körperflüssigkeiten isolierte Krebszellen, insbesondere disseminierte Tumorzellen, deren Zustand biologisch oder ein nach Isolierung induzierter künstlicher Zustand ist bzw. daraus abgeleitete Zellbestandteile.

5 Anwendungen wie die Formulierung von autologen oder heterologen Impfstoffen im therapeutischen Bereich oder die Etablierung von Kontrollen in diagnostischen Testsystemen seien hier beispielhaft genannt.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Krebszellmaterials als Therapeutikum, d.h. zur Herstellung pharmazeutischer und/oder tierarzneilicher Mittel für die Therapie, oder als Target im diagnostischen, therapeutischen, tierexperimentellen oder wissenschaftlichen
15 Bereich.

So kann das erfindungsgemäße Krebszellmaterial dazu verwendet werden, bestimmte Muster, insbesondere genomische Dispositionen und/oder Expressionsprofile, zu charakterisieren. In
20 Abhängigkeit vom zugrundeliegenden Krankheitsbild, insbesondere der Art und des Verlauf einer Krebserkrankung gegebenenfalls unter Berücksichtigung bereits vorgenommener therapeutischer Maßnahmen, lassen sich für diagnostische und/oder therapeutische Verfahren brauchbare auf einen bestimmten Erfolg
25 abzielende Handlungsanweisungen zur Verfügung stellen.

Die Verwendung als Therapeutikum bezieht sich insbesondere auf vitale Krebszellen und ganz besonders auf die Etablierung von Vakzinen. Neben der ebenfalls möglichen heterologen
30 Immunisierung betrifft dies insbesondere die autologe Immunisierung. Zu diesem Zweck wird das erfindungsgemäße Krebszellmaterial gegebenenfalls in geeigneter Weise aufbereitet, so daß gegen die Oberfläche der Zellen oder gegen Zellbestandteile, nach Injektion in Form einer verträglichen
35 Formulierung, Antikörper und/oder immunreaktive Zellen gebildet werden. Zu nennen ist auch die Verwendung als Drug-Vehicle, d.h. als spezifisches in-vivo-Transportmedium insbesondere für therapeutisch wirksame Substanzen. Im Rahmen einer weiteren

therapeutischen Verwendung wird das entnommene Krebszellmaterial zunächst modifiziert - zu nennen wären hier beispielsweise Methoden, die unter den Schlagwörtern Mikroinjektion, Gentransfer, Antisense, knock out etc. bekannt sind - und dann dem zu behandelnden Individuum wieder zugeführt, beispielsweise durch Reinfusion.

Als Target findet das erfindungsgemäße Krebszellmaterial Verwendung im diagnostischen, therapeutischen, tierexperimentellen und wissenschaftlichen Bereich.

Die Verwendung im diagnostischen Bereich betrifft insbesondere die Charakterisierung von Krebszellen aus Körperflüssigkeiten. Die Charakterisierung beinhaltet sowohl die Identifizierung und den Nachweis der Krebszellen als solche, als auch die Bestimmung einer oder mehrerer Parameter an diesen Krebszellen. Im Hinblick auf menschliche oder nicht-menschliche tierische Individuen bezieht sich diese Verwendung insbesondere auf das in der WO 99/10528 beschriebene Verfahren zur Charakterisierung disseminierter und mikrometastasierter Krebszellen anhand von DNA und/oder RNA.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur Charakterisierung disseminierter und mikrometastasierter bzw. metastasierender Krebszellen anhand von DNA und/oder RNA, wobei man aus Körperflüssigkeit eines Individuums nach dem erfindungsgemäßen Verfahren abgetrennte Krebszellen anhand von DNA und/oder mRNA auf wenigstens ein krebsspezifisches Gen untersucht und die gleiche Untersuchung mit Nichtkrebszellen desselben Individuums zum Vergleich durchführt und gegebenenfalls auch aus Körperflüssigkeit eines Individuums auf herkömmliche Art und Weise gewonnene Zellen, in der Regel zellhaltige Fraktionen der betreffenden Körperflüssigkeit, anhand von mRNA auf wenigstens ein krebsspezifisches Gen untersucht. Besondere Ausgestaltungen und Ausführungsformen dieses Verfahrens ergeben sich unter Bezugnahme auf die in der WO 99/10528 in den Ansprüchen 1 bis 10 offenbarten Verfahren, insbesondere unter Berücksichtigung

der im Glossar genannten Gene und weiterer in der WO 99/10528
offenbarter Kombinationen bestimmter Gene zur Vornahme von
Multiparameter-Expressionsanalysen sowie genomischer
Untersuchungen auf Onkogene und/oder mutierte
5 Tumorsuppressorgene.

Unabhängig von und auch zusätzlich zur Charakterisierung anhand
von DNA und/oder RNA kann man am erfindungsgemäßen
Krebszellmaterial auch Proteine, Zucker,
10 Glykosylierungsstrukturen, Ribozyme und ähnliches untersuchen,
um disseminierte und mikrometastasierte bzw. metastasierende
Krebszellen zu charakterisieren.

Insbesondere beinhaltet die Identifizierung und
15 Charakterisierung isolierter Krebszellen die Durchführung
krebsnachweisender Analysen, beispielsweise Analysen der
Nukleinsäuren auf Mutationen, Insertionen, Deletionen, LOH,
Amplifikationen, Aberrationen im Chromosomensatz und
dergleichen; tumorbiologisch relevanter Analysen zur Messung
20 verschiedenster zellphysiologischer Parameter, die
beispielsweise mit der Metastasierung, dem Zellzyklus, der
Proliferation oder der Apoptose von Krebszellen zusammenhängen;
Analysen pharmakologisch relevanter Parameter, wobei die
isolierten Zellen in vitro unter verschiedenen Bedingungen,
25 beispielsweise unter Zusatz von Cytostatika, Antagonisten und
dergleichen kultiviert werden, so daß verschiedene
Therapieformen in vitro getestet und für jeden Patienten
individuell optimiert werden können; Bioassays, in denen
Aktivierungen, Inhibitionen oder sonstige Veränderungen der
30 isolierten Krebszellen durch zellwirksame Moleküle, wie
Cytokine, Chemokine, Hormone, Wachstumsfaktoren, Liganden,
chemische oder biologische Analoga, die Apoptisierbarkeit der
isolierten Krebszellen oder deren apoptisches Potential
gegenüber anderen Targetzellen oder auch die
35 Strahlungssensitivität der isolierten Krebszellen zur
individuellen Dosisabschätzung für einen Patienten bestimmt
werden können; cytologische Analysen, unter Anwendung bekannter
Methoden, wie der Immunhistochemie, Gegenfärbung, FISH- oder

sonstiger cytologischer Nachweis- und Färbeverfahren. Folgende Analysen seien beispielhaft genannt:

- Krebsnachweisende DNA/RNA-Analysen, die Onkogene bzw.
- 5 Tumorsuppressorgene, wie p53, Gene der ras-Familie, erb-B2, c-myc, mdm2, c-fos, DPC4, FAP, nm23, RET, WT1 u.ä., LOH's, beispielsweise im Hinblick auf p53, DCC, APC, Rb u.ä. sowie BRCA1 und BRCA2 bei hereditären Tumoren, Mikrosatelliten-
- 10 Instabilität von MSH2, MLH1, WT1 u.ä., tumoröse RNA's, wie CEA, Cytokeratine, z.B. CK20, MUC1, MAGE3, Muc18, Tyrosinase, PSA, PSM, BA46, Mage-1 u.ä., oder morphogene RNA's, wie Maspin, HCG, GIP, Motilin, hTG, SCCA-1, AR, ÖR, PR, verschiedene Hormone u.ä., betreffen;
- 15 -- Analysen tumorbiologisch-relevanter RNA's und Proteine, die das Metastasierungsprofil, d.h. die Expression von Angiogenese-, Motilitäts-, Adhäsions- und Matrixdegradationsmolekülen, wie bFGF, bFGF-R, VEGF, VEGF-R's, wie VEGF-R1 oder VEGF-R2, E-Cadherin, Integrine, Selectine, MMP's, TIMP's, SF,
- 20 SF-R u.ä., das Zellzyklus- bzw. Proliferationsprofil, wie Cycline (z.B. das Expressionsverhältnis von Cyclin D, E und B), Ki67, P120, p21, PCNA u.ä., oder das Apoptose-Profil, wie FAS (L+R), TNF (L+R), Perforin, Granzyme B, BAX, bcl-2, Caspase 3 u.ä., betreffen.

25

- Die Durchführung derartiger Verfahren im Rahmen von Screening-Verfahren u.a. zur Tumorfrüherkennung und/oder Lokalisation von Tumoren bietet sich an. Weiterhin sind spezifische Anwendungen zu nennen, beispielsweise der Nachweis eines bestimmten
- 30 Karzinoms oder einer bestimmten Mutation, letzteres z.B. in der Nachsorge, z.B. als Verlaufskontrolle, insbesondere im Hinblick auf eine Mutation, auf deren Basis sich der Tumor entwickelt hat. Diese spezifischen Anwendungen können vorteilhafterweise als Testsysteme bereitgestellt werden, gegebenenfalls mit
- 35 Anleitung und weiteren Testkomponenten, wie Primern, Kontrollen etc., beispielsweise in Form von Kits.

Weitere Verwendungen im diagnostischen Bereich betreffen die

Qualitätskontrolle zellhaltiger Präparate, z.B. den Nachweis von Tumorzellen in Blutkonserven, in der Transplantationsmedizin zur Kontrolle von Stammzellpräparaten und sonstigen Transplantaten, gegebenenfalls nach Entfernung von Krebszellen, sowohl in autologen Präparaten als auch bei heterologen Präparaten, die unter Umständen auch dann Krebszellen enthalten können, wenn der Nachweis einer Erkrankung durch einen soliden Tumor noch nicht erfolgt ist. Im forensischen Bereich gelingt so die Verursacheridentifikation bei Tumorerkrankungen, die durch Blutkonserven oder andere Transplantationsprodukte vermittelt werden.

Die Verwendung des erfindungsgemäßen Krebszellmaterials in der Therapie bezieht sich insbesondere auf die Therapieentwicklung, die Therapieauswahl, das Therapie-Monitoring und die Beurteilung evtl. bestehender Therapieresistenzen.

Im Rahmen der Therapieentwicklung ist beispielsweise das Drug-Targeting zu nennen, insbesondere der Einsatz des erfindungsgemäßen Krebszellmaterials bei der Identifizierung neuer therapeutischer Targets, der Identifizierung einer weiteren Zielgruppe für gegebenenfalls bereits zugelassene Medikamente, wobei man insbesondere die Expression des Targets und/oder Polymorphismen unter dem Einfluß bestimmter Therapeutika, wie z.B. Antikörpern, Liganden und Rezeptoren, Enzymen, Inhibitoren, Chemotherapeutika, Lektinen, Lipiden, katalytischen Substanzen etc. beurteilt, die Effektoren, wie zum Beispiel Signaltransduktionsfaktoren, oder Effekte, wie z.B. Präapoptose, Apoptose, Anergie, weitere den Zellzyklus betreffende Effekte etc. bestimmt, oder beispielsweise auf Veränderungen durch clonale Selektion ggf. vor und/oder nach Behandlung mit bestimmten Wirkstoffen untersucht. Weiterhin betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Krebszellmaterials im Rahmen der Therapieentwicklung auch die Überprüfung therapeutischer Targets durch ex-vivo Untersuchungen, beispielsweise in Zellkulturen und an Tiermodellen.

Im Rahmen der Wirkstoffentwicklung findet das erfindungsgemäße Krebszellmaterial Anwendung im Screening von Wirkstoffen, z.B. zur Identifizierung und Charakterisierung von Leitsubstanzen, z.B. Vektoren, Antisense-Molekülen, Ribozymen, Toxinen, Chemotherapeutika, Antihormonen, etc. In der Regel und vor allem nach einem High Throughput Screening (HTS) fallen im Rahmen des Drug Discovery Prozesses mehrere Hits oder Leitsubstanzen an, und eine weitere Einengung der weiter zu verfolgenden Substanzen kann ex-vivo, in-vitro und/oder in vivo, z.B. im Tiermodell, an dem erfindungsgemäßen Krebszellmaterial vorgenommen werden. Dabei kann ein Bezug zur aktuellen Tumorsituation hergestellt werden.

In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Entwicklung von Wirkstoffen gegen die Oberflächenstrukturen von Krebszellen zu erwähnen. Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, mit denen Makromoleküle geschaffen werden können, die an bestimmte Strukturen binden, wobei Spezifität und Affinität durch selbst-optimisierende Prozesse stetig verbessert werden. Unerwünschte Bindungseigenschaften werden durch Ausleseprozesse eliminiert. Unter Verwendung des erfindungsgemäßen Krebszellmaterials als Träger der gewünschten Strukturen lassen sich so spezifische Therapeutika entwickeln, wie Antikörper, Aptamere etc.

Auch im Sekundär-Screening finden die erfindungsgemäßen Krebszellen Anwendung. In der Regel müssen die im Primär-Screening identifizierten Substanzen noch optimiert werden, beispielsweise im Hinblick auf ihre Herstellbarkeit, die Synthesekosten, die Stabilität, kinetische Eigenschaften, ihr Metabolisierungsverhalten u.ä. Ein wichtiger Faktor ist die optimale Wirkung auf das therapeutische Target. Diese und weitere Optimierungsprozesse können in vorteilhafter Weise durch ex-vivo Untersuchungen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Tumorzellen vorgenommen werden, da diese eines der wesentlichen therapeutischen Targets darstellen. Durch die Verwendung dieser Krebszellen kann bei der Wirkstoffentwicklung auch der krebszellspezifische Metabolismus berücksichtigt werden, was insbesondere für die

Entwicklung von Prodrugs von erheblicher Bedeutung ist. Wünschenswert ist eine spezifische Aktivierung in oder an der Zielzelle, beispielsweise unter Abspaltung anderer Bestandteile aus Wirkstoffkonjugaten, die auf diese Weise erst durch eine krebszellspezifische Aktivität in eine wirksame Form überführt werden. Ein weiteres Einsatzgebiet der erfindungsgemäßen Krebszellen ist die Entwicklung und/oder Überprüfung von Vektoren, beispielsweise für gentherapeutische Ansätze, mit denen Nukleinsäure effektiv in die Krebszellen eingeschleust werden können. Unter Verwendung des erfindungsgemäßen Krebszellmaterials können Vektoren an die Struktur der Zielzelle, insbesondere an ihre genetische Ausstattung, angepaßt werden, und es kann ex-vivo die Effektivität des Einschleusungsprozesses überprüft werden.

Weiterhin finden das erfindungsgemäße Krebszellmaterial Verwendung bei der Bestimmung der therapeutischen Breite eines Wirkstoffs, indem man in-vitro die Wirkung eines Wirkstoffes auf Krebszellen und Nichtkrebszellen miteinander vergleicht. Beispielsweise soll sich eine zytostatische Therapie im Idealfall ausschließlich auf die Krebszellen auswirken. Mit dieser Anwendung lassen sich eventuelle Nebenwirkungen erkennen.

Mit Blick auf die vorstehenden Ausführungen ergibt sich unmittelbar, daß das erfindungsgemäße Krebszellmaterial auch dazu verwendet werden kann, eine im Einzelfall geeignete Therapie auszuwählen, die nicht nur durch die Art des Krebses bestimmt wird, sondern vom jeweiligen Individuum und vom Stadium der Erkrankung abhängt.

Verwendung finden die erfindungsgemäßen Krebszellen auch im Therapiemonitoring, d.h. der zeitabhängigen Beurteilung einer therapeutischen Maßnahme. Diese Anwendung ergibt sich sowohl bei einem bestehenden soliden Tumor, der entweder diagnostiziert oder, in einem Tier, auch transplantiert oder induziert worden sein kann. Möglich ist auch die Übertragung erfindungsgemäßen Krebszellmaterials auf ein Tier, wie Mäusen,

Ratten und anderen Säugern, Hühnereiern und ähnlichem. Es können Kinetiken zum zeitlichen Verlauf der Krebszell-Konzentration in der untersuchten Körperflüssigkeit und der Entwicklung ausgewählter Parameter der Krebszellen aufgenommen werden.

Weiterhin können unter Verwendung des erfindungsgemäßen Krebszellmaterials ggf. vorhandene Therapieresistenzen, beispielsweise gegen Chemotherapeutika und andere Wirkstoffe gegen Krebs erkannt werden. Hier bieten sich sowohl in-vitro als auch ex-vivo Analysemethoden und Testsysteme an.

Auch kann das erfindungsgemäße Krebszellmaterial zur Etablierung hochspezifischer Tumormodelle verwendet werden, z.B. um gezielt Tumore zu induzieren oder die Auswirkungen von erfindungsgemäßen Krebszellmaterial auf und dessen Verhalten in Organismen zu beurteilen. Dazu können die Krebszellen, gegebenenfalls in markierter Form, geeigneten Versuchstieren, beispielsweise durch Reinfusion, zugeführt werden.

Weiterhin wird das erfindungsgemäße Krebszellmaterial zur Untersuchung zahlreicher wissenschaftlicher und praktischer Fragestellungen verwendet, beispielsweise zur Identifizierung und/oder Charakterisierung von Tumorinduktoren und Tumorenancern, wie z.B. Viren, Bakterien, intrazellulären Parasiten, alkylierenden und anderen mutagenen Substanzen, etc.; zur Bereitstellung neuer Strukturen, beispielsweise zur Identifizierung und Isolierung neuer Gene, Genprodukte, Proteine, Glykosilierungsstrukturen, etc., u.a. im Hinblick auf neue therapeutische Targets und/oder Diagnose-Tools; zur Induktion von Knock outs und zu Funktionsuntersuchungen; zur Identifizierung bestimmter Expressionsprofile, beispielsweise veränderter Genexpressionsmuster in Abhängigkeit vom tumorbiologischen Zustand einer Krebszelle, u.a. im Hinblick auf die Metastasierung, Resistenzentwicklung vor, während und/oder nach Therapie, oder im Vergleich zu Zellen aus Normal-, Primärtumor-, Rezidivtumor- oder aus Metastasengewebe; zur Identifizierung bestimmter Polymorphismen oder Kombinationen;

zur Untersuchung der Variabilität genetischer Information, beispielsweise zur Identifizierung struktureller Nukleinsäure-Änderungen, wie Mutationen, Splice-Varianten, etc.; im Proteomics-Bereich, sowohl analytisch als auch präparativ ggf. mit Folgeanwendungen, beispielsweise mit Hilfe konvokaler Laserscanning-Mikroskopie oder anderen Verfahren, wie Maldi-Tof, ES-MS/MS; zur Untersuchung von Zell/Zell-Interaktionen, wozu man beispielsweise erfindungsgemäßes Krebszellmaterial zusammen mit manipulierten Killerzellen inkubieren kann; zur Isolierung und Charakterisierung von Krebszellbestandteilen sowohl aus kultivierten als auch aus nicht-kultivierten Krebszellen, beispielsweise Proteine, wie Lipo-, Glycoproteine, etc., Peptide, Lipide, Kohlenhydrate, etc. An dem erfindungsgemäßen Krebszellmaterial lassen sich Zusammenhänge von Entstehung, Entwicklung und Wirkung therapeutischer Ansätzen aufklären, und darauf aufbauend werden neue therapeutische Ansätze zur Verfügung gestellt, vor allem auch im Hinblick auf die Rationale für Kombinationen therapeutischer Ansätze.

Erfordert die Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Krebszellen eine vorherige Isolierung von Nukleinsäuren, Proteinen oder anderen Zellbestandteilen, so sind dem Fachmann eine Vielzahl verschiedener Verfahren bekannt, mit denen er dieses bewerkstelligen kann. Beispielfhaft seien hier lediglich einige wenige Methoden aufgezeigt.

Zur Isolierung genomischer DNA kann man die Zellen, beispielsweise unter Einwirkung von Detergentien und/oder Proteinasen, lysieren, Proteine entfernen und die DNA, beispielsweise durch Ausfällen mit bekannten organischen Lösungsmitteln, isolieren. Verfahren auf Basis von Guanidinisothiocyanat und Phenol enthaltenden Lösungen werden bevorzugt. Auch eine chromatographische Aufreinigung, d.h. eine Trennung von Nukleinsäuren und anderen Zellbestandteilen und/oder eine Trennung von Nukleinsäuren unterschiedlicher Art, beispielsweise mittels Extraktion an festen Phasen, wie

Silikaten und ähnlichem, z.B. mit handelsüblichen Spin-Säulen, kann sinnvoll sein. Weitere bekannte Methoden, wie Sondentechniken, Elektrophorese, Elektroosmose, osmotischer Schock, können zweckmäßig sein. Ähnliche Verfahrensmaßnahmen finden bei der Isolierung von Gesamt-RNA Anwendung. Aus dieser Gesamt-RNA kann wiederum mRNA isoliert werden, indem man z.B. auf Oligo-(dT) basierende Systeme verwendet. Die Wahl eines zweckmäßigen Protokolls unterliegt fachmännischem Wissen.

- 10 Die isolierten Nukleinsäuren können dann zur weiteren Identifizierung und Charakterisierung in einer Vielzahl von Applikationen eingesetzt werden. Hierzu gehören beispielsweise die PCR, RT-PCR, DD-RT-PCR, cDNA-Synthese, Primerextension, restriktionsenzymatische Verdauung, Southern-Blotting,
- 15 Markierungs- und Modifizierungsreaktionen, Northern-Blotting, Klonierung, Sequenzierung, in vitro-Transcription oder in vitro-Translation. Einige der vorstehend genannten Applikationen können auch an einer oder wenigen Zellen ohne vorherige Isolierung von Nukleinsäuren vorgenommen werden,
- 20 insbesondere die RT-PCR. Die Wahl einer geeigneten Applikation hängt nicht nur von der Art der Nukleinsäure, sondern auch von der genetischen Information ab, anhand derer die Krebszellen identifiziert und charakterisiert werden sollen.
- 25 Besonders vorteilhaft ist die erfindungsgemäß resultierende hohe Reinheit und isolationstechnische Unberührtheit der isolierten Krebszellen. Dies ermöglicht es, bestimmte Funktionsteste z.B. im Hinblick auf Pharmakogenomics (Test mit bestimmten Wirkstoffen) oder auf Veränderungen der isolierten
- 30 Tumorzellen (Gen-Therapy, Gen-Replacement) durchzuführen. Desweiteren kann, durch die Reinheit der Zellen bedingt, ein sogenanntes "Drug-Targeting" durchgeführt werden. So ist z.B. aufgrund einer nachgewiesenen erb-B2 Amplifikation eine Therapie mit anti-erb-B2 Antikörpern oder anderen Liganden
- 35 angezeigt; Progesteron- oder Östrogenrezeptor-exprimierende Tumorzellen sind einer sogenannten anti-Hormon-Therapie zugänglich. Weist man in den Krebszellen beispielsweise eine Mutation des Genes für β -Tubulin nach, so würde dies eine

Kontraindikation von Taxol® darstellen. Gleiches gilt für den Nachweis bestimmter Splicevarianten des Östrogenrezeptors im Hinblick auf Tamoxifen®.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Sets zur Isolierung und gegebenenfalls zur anschließenden Identifizierung und Charakterisierung disseminierter und metastasierter Krebszellen. Auch Sets zur Depletion von Krebszellen aus zellhaltigen Präparaten, insbesondere
- 10 Körperflüssigkeiten oder Isolaten sind Gegenstand der Erfindung. Derartige Sets sollten möglichst einfach zu handhaben und im wesentlichen gebrauchsfertig sein. Eine bevorzugte Anordnung bietet die Sets in Kit-Form an. Essentielle Komponente geeigneter Sets ist wenigstens ein
- 15 erfindungsgemäßes Sieb. Dieses Sieb kann im Sinne von ready-to-use bereits der Verwendung entsprechend angepaßt sein, es kann aber auch als eine Art Rohmaterial dem Set beigelegt sein, das vom Benutzer dann den jeweiligen Anforderungen entsprechend angepaßt, beispielsweise auf bestimmte Labware zugeschnitten
- 20 werden kann. Zusätzlich können Komponenten vorhanden sein, die es ermöglichen,
- zellhaltige Körperflüssigkeit oder Teile davon durch das Sieb zu führen, beispielsweise säulenartige Teile, in denen das Sieb zweckmäßig angeordnet und vorzugsweise auch
 - 25 wieder entfernt werden kann;
 - den Siebdurchlauf aufzufangen;
 - die Zellen oder Zellbestandteile vom Sieb abzulösen und/oder diese dann aufzunehmen, beispielsweise Lösungen, wie Puffer, Kulturmedien oder organische Lösungsmittel
 - 30 und/oder Lösungsgemische, wie Ethanol, Chloroform, Isoamylalkohol, Isopropanol, Guanidinisothiocyanat, Phenol und Gemische davon, z.B. Trizol®, vorzugsweise als gebrauchsfertige Lösungen oder Lösungsmittelgemische, die in vorzugsweise zentrifugierbaren Behältnissen und auch
 - 35 getrennt von diesen angeboten werden können;
 - Nukleinsäuren, Proteine oder andere Zellbestandteile der isolierten Krebszellen zu isolieren oder zumindest für eine im Hinblick auf anschließende Analysen zweckmäßige

Isolierung vorzubereiten, beispielsweise die zuvor genannten Lösungen, Spin-Säulen mit geeigneten Festphasen, Oligo-dT-Systeme u.ä..

Derartige Sets sind universell einsetzbar und weitgehend von der Art der gegebenenfalls durchzuführenden vorbereitenden Aufarbeitung der zellhaltigen Körperflüssigkeit und den sich anschließenden Verwendungen, z.B. den zur Identifizierung und Charakterisierung isolierter Krebszellen vorzunehmenden Analysen, unabhängig.

Ferner können Komponenten vorhanden sein, die es ermöglichen,

- eine vorbereitende Aufarbeitung der zellhaltigen Körperflüssigkeit durchzuführen, beispielsweise zur Isolierung von Zellen oder bestimmter zellhaltiger Fraktionen aus dieser Körperflüssigkeit;
- die zur Identifizierung und Charakterisierung isolierter Krebszellen angestrebten Analysen, insbesondere Untersuchungen der oben genannten Gene und Proteine, durchzuführen, beispielsweise Primer, Mittel zur Amplifikation, Detektion und/oder Kontrollen. Bei den Kontrollen kann es sich auch um erfindungsgemäßes Krebsmaterial handeln;

Aufgrund der Vielfalt derartiger Maßnahmen sind diese Komponenten - wenn überhaupt - in der Regel nur in beschränktem Umfang in dem erfindungsgemäßen Set untergebracht, d.h. es wird jeweils auf eine bestimmte Körperflüssigkeit und/oder eine oder wenige Analysen abgestellt. Es handelt sich dann um Kits zur Durchführung einer Identifizierung und Charakterisierung isolierter Krebszellen anhand eines oder weniger Parameter.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

Beispiel 1

Isolierung disseminierter Krebszellen aus Blut.

10 ml heparinisiertes Blut werden abzentrifugiert (400 g; 10 min; RT). Das Überstehende Plasma wird abgenommen. Die pelletierten Zellen werden in 12 ml PBS aufgenommen. Nach

Dichtegradientenzentrifugation (Nycodenz 1.077; 800 g; 30 min, RT) werden die Interphasezellen (mononukleäre Zellen, kurz MNC) abgenommen und 2 x in 10 ml PBS (1 mM EDTA) gewaschen (400 g; 10 min; 4°C). Die MNC's werden in 10 ml PBS aufgenommen (1 mM EDTA, 0,5 % BSA). Als Bezugsgröße wird 1 ml dieses Zellgemisches abgenommen (Kontrollfraktion). Die restlichen 9 ml Zellgemisch werden über eine Säule durch ein aus PE-Fäden gewebtes Sieb mit 20 µm Maschenweite (vertrieben von der SEFAR AG, Rüslikon, Schweiz) geführt und der Siebdurchlauf gesammelt. Die Säule wird 5 x mit je 10 ml PBS (1 mM EDTA) gewaschen. Das Sieb wird herausgenommen, umgedreht und in einem Reaktionsgefäß mit 0,7 ml Trizol® inkubiert (5 min; RT). Das Sieb wird im Reaktionsgefäß oberhalb der Trizol®-Lösung platziert und abzentrifugiert (200 g; 30 s; RT). Das trockene Sieb wird entfernt und die Trizol®-Lösung der weiteren RNA/DNA-Isolation zugeführt.

Alternativ zur Inkubation des Siebes in Trizol® kann das Sieb der Säule entnommen, umgedreht und in PBS (1 mM EDTA, 0,5 % BSA) überführt werden, und die Zellen können durch Zentrifugation (400 g; 10 min, 4°C) pelletiert werden.

Beispiel 2

Isolierung von CD45-positiven Zellen (Kontrollfraktion)

Zur Isolierung von CD45-positiven Lymphozyten als Kontrollfraktionen und auch für die Messung von LOH's werden jeweils 1/10 der MNC's vor und nach dem Siebvorgang (siehe Beispiel 1) abgenommen. Diese werden in ein 1 ml PBS (0.5% BSA, 100 µg hu-IgG) enthaltendes Reaktionsgefäß überführt. Dazu werden 50 µl gewaschene anti-CD45 Microbeads gegeben. Der Ansatz rotiert bei 4°C 20 min. Anschließend wird das Reaktionsgefäß so an einer Magneteleiste positioniert, daß die Microbeads (gebunden an CD45-positive MNC's) an der Gefäßwand pelletieren. Durch dreimaliges Waschen der Bead-Zell-Aggregate erhält man eine reine Population CD45-positiver Lymphozyten, welche dann in Trizol® gelöst der Isolation von Nukleinsäuren zugeführt werden können. CD45-Isolate der MNC's vor dem Siebvorgang werden als Kontrollfraktion A bezeichnet, CD45-

positive Isolate der MNC's nach dem Siebvorgang als Kontrollfraktion B.

Beispiel 3

5 **DNA-Analysen**

Genomische DNA wird in herkömmlicher Weise aus den in den Beispielen 1 und 2 erhaltenen Trizol®-Lösungen isoliert. Die DNA wird dann durch PCR amplifiziert, wobei man die nachstehend angegebenen Primer und Parameter verwendet.

10

1. Analyse der p53, Rb, DCC und APC Allele:

Pro PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien zusammengegeben (μ l):

	10-fach PCR-Puffer	5
15	20 mM dNTP	0.5
	Primer A	0.5
	Primer B	0.5
	TAQ-Polymerase	
	+ TAQ-Start-Antikörper	
20	1:1	0.5
	H ₂ O	40
	DNA	3

Folgende Temperaturprofile werden benutzt:

25

für APC, Rb und DCC:

	<u>95 °C</u>	<u>5 min</u>	
	94 °C	30 sec	
	53 °C	30 sec	35 x
30	<u>72 °C</u>	<u>30 sec</u>	
	72°C	5 min	

für p53

	<u>95 °C</u>	<u>5 min</u>	
35	94 °C	30 sec	
	62 °C	30 sec	35 x
	<u>72 °C</u>	<u>30 sec</u>	
	72°C	5 min	

Als Primerpaare werden benutzt:

p53-LOH:

A: 5'-Fl-Agg gAT ACT ATT CAg CCC CAg gTg

5 B: 5'-ACT gCC ACT CCT TgC CCC ATT C

APC-LOH

A: 5'-FAM-gTA AgC Agg ACA AgA TgA Cag

B: 5'-gCT ATT CTC TCA ggA TCT Tg

10

DCC-LOH

A: 5'-HEX-gAT gAC ATT TTC CCT CTA g

B: 5'-gTg gTT ATT gCC Ttg AAA Ag

15 Rb-LOH

A: 5'-FAM-CTC CTC CCT ACT TAC Ttg T

B: 5'-AAT TAA CAA ggT gTg gTg g

20 Alle Primer werden in einer Konzentration von 20 pmol/ μ l
gelagert. Normale DNA wird immer als negative Kontrolle
eingesetzt. Alle PCR-Amplifikate der LOH- und
Amplifikationsanalysen werden auf einem ABI-Prism Genescan
Genetic Analyser gemessen und ausgewertet.

25

2. Amplifikationsanalyse von erb-B2 und c-myc

Gemessen wird eine Coamplifikation von erb-B2 (c-myc) versus β -Globin.

5

Pro PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien zusammengegeben (μ l):

	c-myc	erb-B2
10-fach PCR-Puffer	5	5
10 MgCl (25 mM)	4	4
20 mM dNTP	0.25	0.25
Primer A	2	1.5
Primer B	2	1.5
β -Globin-Primer A	0.2	0.5
15 β -Globin-Primer B	0.2	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.5	7.5
AmpliTag Gold	0.4	0.4
H ₂ O	25.45	25.85
DNA	3	3

20

Folgendes Temperaturprofil wird benutzt:

	<u>95 °C</u>	<u>10 min</u>	
	95 °C	60 sec	
25	60 °C	60 sec	32x
	<u>72 °C</u>	<u>60 sec</u>	
	72 °C	3 min	

Als Primerpaare werden benutzt:

30

erb-B2

A: 5'-HEX-Cgg ATC TTC TgC TgC CgT Cg

B: 5'-CCT Ctg Acg TCC ATC ATC TC

35

c-myc

A: 5'-HEX-CgT ATT CAT gCC Ttg TAT Ttg

B: 5'-CTT CTT CAT CTT CTT gTT CC

Globin

A: 5'-FAM-ACA CAA Ctg TgT TCA CTA gC

B: 5'-CAA CTT CAT CCA CgT TCA CC

- 5 Alle Primer werden in einer Konzentration von 20 pmol/ μ l
gelagert. Normale DNA wird immer als negative Kontrolle und 5-
fach amplifizierte (erb-B2/c-myc) DNA als positive Kontrolle
eingesetzt. Alle PCR-Amplifikate der LOH- und
Amplifikationsanalysen werden auf einem ABI-Prism Genescan
10 Genetic Analyser gemessen und ausgewertet.

Beispiel 4**Klinische Anwendung**

- 14 Patienten mit unterschiedlichen Karzinomen, ein Patient mit
15 malignem Melanom, sechs Kontrollspender und ein im Vorbefund
auffälliger "Normalspender" wurden untersucht. Es wurden
Analysen tumorspezifischer und tumorassoziierter RNA's sowie
genomische Analysen auf "allele imbalance" (LOH) der Gene p53,
Rb, APC und DCC und Amplifikationsanalysen der Onkogene c-myc
20 und erb-B2 durchgeführt.

- Gemäß Beispiel 1 wurden aus dem Blut eines jeden Patienten die
Kontrollfraktion, der Siebdurchlauf und der Siebrückstand
erhalten. Gemäß Beispiel 2 wurden aus der Kontrollfraktion und
25 dem Siebdurchlauf CD45-positive Zellen als "Wildtyp-Kontrolle"
isoliert (Fraktionen A und B). Die vorstehend genannten
Analysen wurden an den CD45-positiven Zellen der
Kontrollfraktion (A; Bezugsgröße), den CD45-positiven Zellen
des Siebdurchlaufs (Fraktion B) und den Zellen des
30 Siebrückstandes (Fraktion C) durchgeführt.

- Die Ergebnisse der genomischen Analysen sind in nachfolgender
Tabelle I für Patienten und Tabelle II für Kontrollspender
zusammengefaßt. Angegeben sind die relativen Allel-Unterschiede
35 bezogen auf die CD45-Kontrollfraktion A (Bezugsgröße). Als Cut-
off-Wert der LOH-Analysen wurde, bezogen auf die Kontrolle, ein
Wert von $\leq 0,5$, d.h. mindestens 50 % Unterschied, als positiv
gesetzt. Bei den Amplifikationsanalysen wurde ein Cut-off-Wert

von 2,0 gesetzt.

Für fünf der 15 untersuchten Patienten mit etabliertem Karzinom und Melanom konnte nachgewiesen werden, daß disseminierte Krebszellen aus peripherem Blut mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isoliert werden konnten. Dies gelang auch bei einem der Kontrollspender, dessen Vorbefund (Expression der CEA-, CK20- und MUC1-RNA's) Hinweise auf disseminierte Krebszellen gab.

10

Beispiel 5

Charakterisierung des biologischen Zustandes disseminierter Tumorzellen

15 Einer 53-jährigen Patientin mit einem vor 16 Monaten diagnostizierten und behandelten (6xCMF, Radiatio, Tamoxifen) Mammakarzinom (pT2pN1M0, G3) wurde eine Blutprobe entnommen. Disseminierte Tumorzellen wurden gemäß Beispiel 2 isoliert. Diese wiesen ein LOH des p53-Gens, eine Mutation des p53-Gens und eine Amplifikation von c-erbB-2 auf. Die quantitative und auf GADPH normierte Untersuchung der Cyclinexpression ergab folgendes Resultat:

20

Cyclin D: 2,5

25

Cyclin E: 0

Cyclin B: 0

30

Die ausschließliche Expression von Cyclin D spricht für eine G0/1-Phase. Keine der isolierten Zellen befand sich in einem mitotischen Stadium. Die isolierten Tumorzellen waren nicht proliferativ.

35

Einem 64-jährigen Patienten mit einem vor 6 Monaten diagnostizierten und behandelten (5-FU) Colonkarzinom (Dukes C) wurde eine Blutprobe entnommen. Disseminierte Tumorzellen wurden gemäß Beispiel 2 isoliert. Diese wiesen ein LOH des DCC-Gens, ein LOH des E-Cadherin-Gens und eine Amplifikation von c-myc auf. Die quantitative und auf GADPH normierte Untersuchung

der Cyclinexpression ergab folgendes Resultat:

Cyklin D: 0,7

Cyclin E: 4,3

5 Cyclin B: 10,3

Die Expression aller drei Cycline spricht für für einen proliferativen Zustand der isolierten Tumorzellen.

A N S P R Ü C H E

- 5 1. Verfahren zur Isolierung von Krebszellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten, dadurch gekennzeichnet, daß man die zellhaltige Körperflüssigkeit oder Teile davon durch ein Sieb führt, das Krebszellen zurückhält.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Sieb eine Maschen- bzw. Porenweite von etwa 15 bis 30 μm , vorzugsweise von etwa 20 μm aufweist.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst eine zellhaltige Fraktion aus der Körperflüssigkeit isoliert und anschließend siebt.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die auf dem Sieb zurückgehaltenen Zellen vom Sieb ablöst und die erhaltene Zellsuspension durch Zentrifugation pelletiert.
- 25 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Körperflüssigkeit Blut, Knochenmark, Lymphe, Urin, Sputum, Ascites, Ergüsse, Fruchtwasser, Punktate, Colon-, Lungen-, Bronchiallavage, Blasenspülflüssigkeit, Fäces verwendet.
- 30 6. Verfahren zur Gewinnung von Nukleinsäuren aus Krebszellen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine nach den Ansprüchen 1 bis 5 erhaltene Krebszellfraktion in Guanidinisothiocyanat und Phenol enthaltenden Lösungen inkubiert.
- 35 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Entnahme von Krebszellen aus zellhaltigen Präparaten, insbesondere Körperflüssigkeiten oder zellhaltigen Fraktionen davon.

8. Verfahren zur Charakterisierung disseminierter und mikrometastasierter bzw. mikrometastasierender Krebszellen anhand von DNA und/oder RNA, wobei man aus Körperflüssigkeit eines Individuums nach dem erfindungsgemäßen Verfahren abgetrennte Krebszellen anhand von DNA und/oder mRNA auf wenigstens ein krebsspezifisches Gen untersucht und die gleiche Untersuchung mit Nichtkrebszellen desselben Individuums zum Vergleich durchführt und gegebenenfalls auch aus Körperflüssigkeit eines Individuums gewonnene Zellen anhand von mRNA auf wenigstens ein krebsspezifisches Gen untersucht.
9. Set aus einem Sieb und weiteren Mitteln zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
10. Aus Körperflüssigkeiten isolierte Krebszellen, insbesondere disseminierte Tumorzellen, deren Zustand biologisch, vorzugsweise vital, ist, gegebenenfalls im Gemisch mit Nichtkrebszellen, sowie daraus etablierte Zelllinien oder abgeleitete Zellbestandteile.
11. Aus Körperflüssigkeiten isolierte Krebszellen, insbesondere disseminierte Tumorzellen, deren Zustand ein nach Isolierung ausgehend von einem biologischen Zustand induzierter künstlicher Zustand ist, gegebenenfalls im Gemisch mit Nichtkrebszellen, sowie daraus etablierte Zelllinien oder abgeleitete Zellbestandteile.
12. Krebszellen im Gemisch mit Nichtkrebszellen nach einem der Ansprüche 10 oder 11 mit ein Krebszellanteil von wenigstens 50%, vorzugsweise von wenigstens 80% und insbesondere von wenigstens 90%, sowie daraus etablierte Zelllinien oder abgeleitete Zellbestandteile.
13. Im wesentlichen reine Krebszellen nach einem der Ansprüche 10 bis 12, sowie daraus etablierte Zelllinien oder abgeleitete Zellbestandteile.

14. Verwendung von Krebszellen nach einem der Ansprüche 10 bis 13 als Therapeutika oder als Target im diagnostischen, therapeutischen, tierexperimentellen oder wissenschaftlichen Bereich.

5

15. Pharmazeutisches oder tierarzneiliches Mittel mit Krebszellen, daraus etablierten Zelllinien oder abgeleiteten Zellbestandteilen nach einem der Ansprüche 10 bis 13 und weiteren Formulierungshilfen, Wirkstoffen und/oder Komponenten eines diagnostischen Tests.

10

15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No.

PCT/EP 99/05386

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/06 C12M3/06 C12Q1/68 A61K35/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIRTE, H.W. ET AL.: "A rapid and simple method for the purification of tumor cells from ascites fluid of ovarian carcinoma" GYNECOLOGIC ONCOLOGY, vol. 44, 1992, pages 223-226, XP002122420 Page 224, first column, first paragraph and lines 6-8 of the second paragraph; Page 225, first column, lines 18-24; Page 226, first column, last sentence	1,2,4,5, 7,9-14
X	EP 0 483 506 A (MICROBYX CORP) 6 May 1992 (06.05.92) Column 2, lines 20-50 — — — — — -/-	1,5,7,9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 1999 (17.11.99)

Date of mailing of the international search report

3 December 1999 (03.12.99)

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Alt, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/05386

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHANTZ, G.D. ET AL.: "Tumour metastasis and cell deformation: Assessment of nucleopore filtration" TREATMENT OF METASTASIS: PROBLEMS AND PROSPECTS, 1985, pages 291-294, XP002122422 See table 1	10-13, 15
X	PITTMAN K ET AL: "Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood" ANNALS OF ONCOLOGY, NL, KLUWER, DORDRECHT, vol. 7, 1996, page 297-301 XP002092615 ISSN: 0923-7534 See page 299, first column	8
A	RYE, P.D. ET AL.: "Immunobead filtration: A novel approach for the isolation and propagation of tumor cells" THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 150, no. 1, 1997, pages 99-106, XP002122421 the whole document	1
A	EP 0 584 715 A (KUEBLER GMBH DR) 2 March 1994 (02.03.94) the whole document	1
A	EP 0 806 666 A (SYNTRON BIORESEARCH INC) 12 November 1997 (12.11.97) the whole document	1
P, X	WO 99 10528 A (UCIECHOWSKI PETER ; AUSTRUP FRANK (DE); EDER CLAUDINE (DE); FEIFEL) 4 March 1999 (1999-03-04) See pages 28-47, reference examples 1-11	8, 10-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/EP 99/05386

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0483506	A	06-05-1992	AT 156186 T	15-08-1997
			CA 2050773 A	26-03-1992
			DE 69127047 D	04-09-1997
			JP 4258764 A	14-09-1992
EP 0584715	A	02-03-1994	DE 4228389 A	03-03-1994
			AT 174959 T	15-01-1999
			DE 4244715 A	28-04-1994
			DE 9321535 U	05-08-1999
			DE 59309239 D	04-02-1999
			ES 2126618 T	01-04-1999
			GR 3029774 T	30-06-1999
			JP 6205671 A	26-07-1994
			US 5529903 A	25-06-1996
EP 0806666	A	12-11-1997	US 5821073 A	13-10-1998
			JP 10010125 A	16-01-1998
WO 9910528	A	04-03-1999	DE 19736691 A	25-02-1999



PCT/EP 99/05386

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N5/06 C12M3/06 C12Q1/68 A61K35/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprodukt (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C120

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>HIRTE, H.W. ET AL.: "A rapid and simple method for the purification of tumor cells from ascites fluid of ovarian carcinoma" GYNECOLOGIC ONCOLOGY, Bd. 44, 1992, Seiten 223-226, XP002122420</p> <p>Seite 224, erste Spalte, erster Paragraph und Zeilen 6-8 des zweiten Paragraphs; Seite 225, erste Spalte, Zeilen 18-24; Seite 226, erste Spalte, letzter Satz</p>	1,2,4,5, 7,9-14
X	<p>EP 0 483 506 A (MICROBYX CORP) 6. Mai 1992 (1992-05-06) Spalte 2, Zeilen 20-50</p>	1,5,7,9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

X Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

2. Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

^T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist.

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann hilfreich ist.

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Abgabedatum des Internationalen Recherchenberichts

17. November 1999

03/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Alt. G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SHANTZ, G.D. ET AL.: "Tumour metastasis and cell deformation: Assessment of nucleopore filtration" TREATMENT OF METASTASIS: PROBLEMS AND PROSPECTS, 1985, Seiten 291-294, XP002122422 siehe Tabelle 1	10-13,15
X	PITTMAN K ET AL: "Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood" ANNALS OF ONCOLOGY, NL, KLUWER, DORDRECHT, Bd. 7, 1996, Seite 297-301 XP002092615 ISSN: 0923-7534 siehe Seite 299, erste Spalte	8
A	RYE, P.D. ET AL.: "Immunobead filtration: A novel approach for the isolation and propagation of tumor cells" THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 150, Nr. 1, 1997, Seiten 99-106, XP002122421 das ganze Dokument	1
A	EP 0 584 715 A (KUEBLER GMBH DR) 2. März 1994 (1994-03-02) das ganze Dokument	1
A	EP 0 806 666 A (SYNTRON BIORESEARCH INC) 12. November 1997 (1997-11-12) das ganze Dokument	1
P, X	WO 99 10528 A (UCIECHOWSKI PETER ; AUSTRUP FRANK (DE); EDER CLAUDINE (DE); FEIFEL) 4. März 1999 (1999-03-04) siehe Seiten 28-47, Referenzbeispiele 1-11	8,10-15

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu neuen Patentfamilie gehören

tionales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05386

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0483506	A	06-05-1992	AT	156186 T	15-08-1997
			CA	2050773 A	26-03-1992
			DE	69127047 D	04-09-1997
			JP	4258764 A	14-09-1992
EP 0584715	A	02-03-1994	DE	4228389 A	03-03-1994
			AT	174959 T	15-01-1999
			DE	4244715 A	28-04-1994
			DE	9321535 U	05-08-1999
			DE	59309239 D	04-02-1999
			ES	2126618 T	01-04-1999
			GR	3029774 T	30-06-1999
			JP	6205671 A	26-07-1994
EP 0806666	A	12-11-1997	US	5821073 A	13-10-1998
			JP	10010125 A	16-01-1998
WO 9910528	A	04-03-1999	DE	19736691 A	25-02-1999



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 05 JAN 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

PCT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/39091-PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05386	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/07/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 27/07/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N5/06		
Anmelder GIESING, Michael et. al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 9 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 13/01/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 29.12.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Alt, G Tel. Nr. +49 89 2399 8545 



I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-40 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-21 eingegangen am 24/11/2000 mit Schreiben vom 24/11/2000

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:



5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 17 (teilweise).

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 17 (teilweise) beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung



Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-21
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-21
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-16, 17 (teilweise), 18-21
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt



Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Der Teil des Anspruchs 17, der sich mit der Verwendung disseminierter Tumorzellen als Therapeutika befaßt, bezieht sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit dieses Teils des Gegenstands des Anspruchs kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Neuheit (Artikel 33(2) PCT)

2. **D1=HIRTE, H.W. ET AL.: 'A rapid and simple method for the purification of tumor cells from ascites fluid of ovarian carcinoma' GYNECOLOGIC ONCOLOGY, Bd. 44, 1992, Seiten 223-226** beschreibt ein Verfahren zur Isolierung von Tumorzellen, die in Ascites- Flüssigkeit von Eierstockkarzinomen als Zellklumpen vorliegen. Gemäss Seite 225, rechte Spalte, Zeile 23 des Dokumentes ist dies der natürliche Zustand der Zellen bei dieser Art von Tumor.

D2= EP-A-584715 bezieht sich auf ein Verfahren zur Isolierung von zirkulierenden Tumorzellen durch Zentrifugation mit nachfolgender Eliminierung der Nichtkrebszellen und in vitro-Vermehrung der Krebszellen.

Mit dem Verfahren nach Ansprüchen 1-7 der Anmeldung werden disseminierte Tumorzellen durch Anwendung eines Siebes mit einer Porenweite von 15-30µm isoliert. Der Anmelder hat glaubhaft gemacht, dass es sich bei "disseminierten" Tumorzellen um einen besonderen Zelltyp handelt, der sich von Zellen eines Tumors unterscheidet. Meistens kommen solche disseminierten Zellen als Einzelzellen vor. Sollte es zu einer Aggregatbildung kommen, dann sind diese Aggregate nicht mit den Zellklumpen aus D1 gleichzusetzen, da letztere im



Prinzip Zellen eines soliden Tumors entsprechen, die andere physiologische und genetische Merkmale besitzen wie die Zellen, die sich abgelöst haben und zirkulieren.

Die Neuheit des Gegenstand der Ansprüche 1-7 wird daher anerkannt.
Entsprechendes gilt für den Gegenstand des Anspruchs 8.

3. Das Verfahren des Anspruchs 9 ist ebenfalls als neu einzustufen, da es als einen Schritt das Verfahren der Ansprüche 1-7 enthält.
4. Anspruch 10 bezieht sich auf die Verwendung eines Siebes mit einer Maschen-, bzw. Porenweite von ca. 15-30µm zur Isolierung disseminierter Tumorzellen. Solche Siebe sind zwar an sich aus dem Stand der Technik bekannt (siehe zum Beispiel D1, die einen 30µm nylon mesh filter beschreibt), nicht jedoch die im Anspruch angegebene Verwendung. Der Gegenstand des Anspruchs 10 ist daher neu.
5. D2 beschreibt ein Verfahren zur Isolierung und Vermehrung disseminierter Tumorzellen. Durch Zentrifugation wird die Fraktion der weissen Blutkörperchen gewonnen, die auch zirkulierende transformierte Zellen enthält. Nachdem Lymphozyten durch Zusatz von B- und T-Zell-spezifischen Antikörpern zerstört wurden, bzw. durch Zugabe von makrophagen-inhibierendem Peptid, wird die mit transformierten Zellen angereicherte Zellfraktion auf Mikrotiterplatten verteilt und vermehrt.
D2 wird als nicht neuheitsschädlich für den Gegenstand der Ansprüche 11-14 angesehen. Der Anmelder hat dazu ausgeführt, dass der Anteil der NK-Zellen, i.e. die Zellen, die durch Verwendung der Anti-CD8 und Anti-CD25 Antikörper eliminiert werden, im peripheren Blut je nach Individuum zwischen 6% und 29% schwanken. Ausserdem exprimiere nur eine Subpopulation der NK-Zellen das CD8-Antigen. Ruhende CD25 Zellen seien darüber hinaus CD25-negativ. Nachdem die Absolutzahl der NK-Zellen im Blut etwa 80. 000 bis 1.000.000 betrage, verblieben selbst nach Abzug der 30% CD8-positiven NK-Zellen wenigstens 56.000 NK-Zellen pro ml Blut. Die Anzahl disseminierter Tumorzellen überschreite aber einen Wert im Bereich von 10 bis 100 Zellen pro ml Blut nicht. Dieser erhebliche Überschuss von Nicht-Tumorzellen scheine auch durch die



nachfolgende Kultivierung nicht derart verändert werden zu können, dass Tumorzellanteile von mindestens 50% erreicht werden würden.

Die IPEA hält es daher für glaubhaft, dass aufgrund der Anreicherungs- und der nachfolgenden Kultivierungsmethode in D2 ein Tumorzellanteil von wenigstens 50% höchstwahrscheinlich nicht erhalten wird.

Der Gegenstand der Ansprüche 15-21 ist neu, da er sich auf die neuen Zellgemische gemäss der Ansprüche 11-14 bezieht.

Erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT)

6. Nächster Stand der Technik ist D2. Dort werden disseminierte Tumorzellen mit Hilfe einer Zentrifugation und nachfolgender in vitro Kultur angereichert. Im Gegensatz dazu wird in der Anmeldung ein Sieb mit einer Maschen- oder Porenweite von 15-30µm benutzt, welches die zirkulierenden Tumorzellen zurückhält. Das Verfahren hat den Vorteil, daß es rasch durchzuführen ist und die Zellen in einem relativ ursprünglichen Zustand ohne Ligandenbindung gewonnen werden.

Das von der Anmeldung zu lösende Problem bezüglich des Verfahrens ist daher die Bereitstellung eines einfach durchzuführenden Verfahrens zur Isolierung von disseminierten Tumorzellen, welches die Zellen in einem Zustand belässt, der dem natürlichen entspricht.

Beispiel 1 in Verbindung mit Beispiel 4 zeigt, dass mit dem beanspruchten Verfahren disseminierte Tumorzellen erhalten werden.

Die in Anspruch 1 formulierte Lösung des Problems scheint im Lichte des zitierten Standes der Technik nicht offensichtlich zu sein. D1 beschreibt zwar die Abtrennung von Tumorzellen durch Filtration. Hier handelt es sich aber wie bereits oben erwähnt, um grössere Zellklumpen, die nicht mit disseminierten Tumorzellen gleichgesetzt werden können. **D3 = EP-A-483506** führt eine Filtration von Blut durch, um Zellen von klinischen Interesse von solchen, die nicht von Interesse sind abzutrennen. Von klinischen Interesse sind solche Zellen, die mit dem PAP-Test, ein Test auf Krebszellen, angefärbt werden können. Von nicht klinischen



Interesse sind zum Beispiel rote und weisse Blutkörperchen. Es werden jedoch Filter mit einer Porenweite von ca. 12 µm und kleiner benutzt.

In D1 oder D3 wird also zwar ein Filter benutzt, einmal jedoch zur Abtrennung von nicht-disseminierten Tumorzellen. Im anderen Fall wird über die zurückgehaltenen Zellen keine Aussage gemacht und die Maschenweite ist anders als die in der Anmeldung gewählt. Daher scheint der Fachmann aus der Lehre dieser beiden Dokumente nicht folgern zu können, dass ein Filter mit einer Maschenweite von 15-30µm für die Abtrennung von zirkulierenden Tumorzellen geeignet ist.

Der Gegenstand der Ansprüche 1-8 beruht daher auf erfinderischer Tätigkeit. Das gilt ebenso für Anspruch 9, der als Verfahrensschritte das Verfahren aus Anspruch 1-7 enthält.

Für den Gegenstand aus Anspruch 10 kann erfinderische Tätigkeit ebenfalls anerkannt werden, da eine Verwendung eines Siebes mit einer Maschen- bzw. Porenweite von etwa 15-30µm im Stand der Technik nicht vorgeschlagen ist.

7. Was die Zellansprüche 11-14 und Ansprüche betrifft, die sich darauf beziehen, könnte D2 ebenfalls als der nächste Stand der Technik angesehen werden. Die disseminierte Tumorzellen enthaltenden Zellgemische aus D2 sind einerseits nicht frei von zu Isolationszwecken verwendeten Liganden und zeichnen sich andererseits nicht durch den angegebenen Tumoranteil aus (siehe oben bei Neuheit). Der Vorteil der Zellgemische der vorliegenden Anmeldung liegt daher darin, dass aufgrund ihrer Reinheit und ihres relativ hohen Gehaltes an Tumorzellen beispielsweise quantitative Analysen der Expression bestimmter tumorbiologisch relevanter Nukleinsäuren durchgeführt werden können.

Dem Gegenstand der Ansprüche 11-14 liegt somit das Problem zugrunde Zellgemische bereitzustellen, die einen hohen Anteil an reinen disseminierten Tumorzellen enthalten und damit modernen Analysemethoden zugänglich sind oder zur Etablierung von Zelllinien und als Pharmazeutika geeignet sind.

Beispiel 4 zeigt die Durchführung von LOH-Analysen und daher, dass die Zellgemische der Anmeldung das Problem lösen.



Der Gegenstand der Ansprüche 11-14 beruht auf einer erfinderischen Tätigkeit, da Tumorzellen, die frei von Zusätzen sind, die zu ihrer Isolierung benötigt werden, im Stand der Technik nicht vorgeschlagen sind. Sowohl die oben erwähnte D2 als auch **D4=RYE, P.D. ET AL.: 'Immunobead filtration: A novel approach for the isolation and propagation of tumor cells' THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 150, Nr. 1, 1997, Seiten 99-106** benutzen direkt oder indirekt Antikörper zur Isolierung oder andere Zusätze (macrophagen-inhibierendes Peptid aus D2). Die Ansprüche 11-14 erfüllen daher der Erfordernisse der Artikels 33(3) PCT.

8. Die Ansprüche 15-20 beschreiben Verfahren mit bzw. Verwendungen der neuen und erfinderischen Zellgemische der Ansprüche 11-14. Die Gegenstände dieser Ansprüche sind daher ebenfalls als erfinderisch einzustufen. Das gilt ebenso für das pharmazeutische Mittel aus Anspruch 21.

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
WO-A-9910528	04.03.1999	24.08.1998	22.08.1997



M/39091-PCT

ANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Isolierung von disseminierten Tumorzellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten, dadurch gekennzeichnet, daß man die zellhaltige Körperflüssigkeit oder Teile davon durch ein Sieb mit einer Maschen- bzw. Porenweite von etwa 15 bis 30 μm führt und die zurückgehaltene Zellfraktion gewinnt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Sieb eine Maschen- bzw. Porenweite von etwa 20 μm aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst eine zellhaltige Fraktion aus der Körperflüssigkeit isoliert und anschließend siebt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die auf dem Sieb zurückgehaltenen disseminierten Tumorzellen, gegebenenfalls im Gemisch mit Nichtkrebszellen, vom Sieb ablöst.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Flüssigkeit in entgegengesetzter Richtung durch das Sieb führt.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Körperflüssigkeit Blut, Knochenmark, Lymphe, Urin, Sputum, Ergüsse, Fruchtwasser, Punkate, Colon-, Lungen-, Bronchiallavage, Blasenspülflüssigkeit, Fäces verwendet.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man als Körperflüssigkeit Blut verwendet.
8. Verfahren zur extrakorporalen Eliminierung von disseminierten Tumorzellen aus zellhaltigen Präparaten, dadurch gekennzeichnet, daß man das zellhaltige Präparat durch ein Sieb mit einer Maschen- bzw. Porenweite von etwa 15 bis 30 μm führt.



9. Verfahren zur Charakterisierung disseminierter Tumorzellen anhand von DNA und/oder RNA, wobei man nach einem Verfahren der Ansprüche 1 bis 7 aus Körperflüssigkeit eines Individuums disseminierte Tumorzellen abtrennt und anhand von DNA und/oder mRNA auf wenigstens ein krebsspezifisches Gen untersucht, und die gleiche Untersuchung mit Nichtkrebszellen desselben Individuums zum Vergleich durchführt.
10. Verwendung eines Siebes mit einer Maschen- bzw. Porenweite von etwa 15 bis 30 μm zur Isolierung disseminierter Tumorzellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten.
11. Disseminierte Tumorzellen umfassendes Zellgemisch, gekennzeichnet durch einen polyklonalen Tumorzellanteil von wenigstens 50%.
12. Zellgemisch nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumorzellen frei von herkömmlicherweise zu Isolationszwecken verwendeten Liganden sind.
13. Zellgemisch nach einem der Ansprüche 11 oder 12, gekennzeichnet durch einen polyklonalen Tumorzellanteil von wenigstens 90%.
14. Disseminierte Tumorzellen umfassendes Zellgemisch nach einem der Ansprüche 11 bis 13, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7.
15. Verfahren zur Isolierung von Zellbestandteilen disseminierter Tumorzellen, wobei man die Zellbestandteile aus wenigstens einem Zellgemisch der Ansprüche 11 bis 14 oder einer Fraktion davon in an sich bekannter Weise gewinnt.
16. Verfahren zur Etablierung von Zelllinien disseminierter Tumorzellen, wobei man wenigstens ein Zellgemisch der Ansprüche 11 bis 14 oder eine Fraktion davon kultiviert.
17. Verwendung von Zellgemischen nach einem der Ansprüche 12 bis 14 als Therapeutika oder als Target im diagnostischen, therapeutischen, tierexperimentellen oder wissenschaftlichen Bereich.



18. Verwendung nach Anspruch 17 zur Identifizierung therapeutischer Targets.
19. Verwendung nach Anspruch 17 zum Screenen von Wirkstoffen.
20. Verwendung nach Anspruch 17 zur Wahl einer individuellen Therapie.
21. Pharmazeutisches oder tierarzneiliches Mittel mit wenigstens einem Zellgemisch nach einem der Ansprüche 11 bis 14 und weiteren Formulierungshilfen, Wirkstoffen und/oder Komponenten eines diagnostischen Tests.



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference M/39091-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/05386	International filing date (<i>day month year</i>) 27 July 1999 (27.07.99)	Priority date (<i>day month year</i>) 27 July 1998 (27.07.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 5/06, C12M 3/06, C12Q 1/68, A61K 35/12		
Applicant GESING, Michael		

<p>1 This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2 This REPORT consists of a total of <u>9</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.</p>	
<p>3 This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 13 January 2000 (13.01.00)	Date of completion of this report 29 December 2000 (29.12.2000)
Name and mailing address of the IPEA EP	Authorized officer
Facsimile No	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

PCT/EP99/05386

I. Basis of the report

1 This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments)

☐ the international application as originally filed.

☒ the description. pages 1-40 , as originally filed.

pages _____ , filed with the demand.

pages _____ , filed with the letter of _____

pages _____ , filed with the letter of _____

☒ the claims. Nos. _____ , as originally filed.

Nos. _____ , as amended under Article 19.

Nos. _____ , filed with the demand.

Nos. 1-21 , filed with the letter of 24 November 2000 (24.11.2000) .

Nos. _____ , filed with the letter of _____

☐ the drawings. sheets/fig _____ , as originally filed.

sheets/fig _____ , filed with the demand.

sheets/fig _____ , filed with the letter of _____

sheets fig _____ , filed with the letter of _____

2 The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description. pages _____

☐ the claims. Nos. _____

☐ the drawings. sheets fig _____

3 ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4 Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05386

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 17 (Part)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 17(Part) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/05386

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III.1

1. The part of Claim 17 relating to the use of disseminated tumour cells as therapeutic agents relates to a subject matter which, in the opinion of this Authority, is covered by PCT Rule 67.1(iv). Consequently, an opinion report is not established on the industrial applicability of this part of the claim (PCT Article 34(4)(a)(i)).



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/05386

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16, 17 (in part), 18-21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Novelty (PCT Article 33(2))

2. D1 - HIRTE, H.W. ET AL.: 'A rapid and simple method for the purification of tumor cells from ascites fluid of ovarian carcinoma' GYNECOLOGIC ONCOLOGY, Vol. 44, 1992, pages 223-226 - describes a method for the isolation of tumour cells present as cell clumps in the ascites fluid of ovarian carcinomas. According to page 225, right-hand column, line 23 of said document, this is the natural state of the cells in this kind of tumour.

D2, EP-A-0 584 715, concerns a method for isolating circulating tumour cells by centrifugation followed by elimination of the non-cancer cells and *in vitro* multiplication of the cancer cells.

In the method according to Claims 1-7 of the application, disseminated tumour cells are isolated using a sieve with a pore width of 15-30 μm . The applicant has shown plausibly that "disseminated" tumour cells are a particular type of cell which differ from the cells of a tumour. Such disseminated cells generally occur as individual cells. Any



aggregate that may form is not the same as the cell clumps from D1, since the latter correspond essentially to cells of a solid tumour and have physiological and genetic features different from the detached and circulating cells.

The novelty of the subject matter of Claims 1-7 is therefore acknowledged. The same applies to the subject matter of Claim 8.

3. The method of Claim 9 is likewise deemed novel, since one of its steps involves the method of Claims 1-7.
4. Claim 10 relates to the use of a sieve with a mesh or pore width of approx. 15-30 μm for isolating disseminated tumour cells. Although such sieves are known per se from the prior art (see, for example, D1, which describes a 30 μm nylon mesh filter), the use indicated in the claim is not. The subject matter of Claim 10 is therefore novel.
5. D2 describes a method for isolating and multiplying disseminated tumour cells. The fraction of white blood corpuscles containing the circulating transformed cells is obtained by centrifugation. After lymphocytes have been destroyed by the addition of B- and T-cell-specific antibodies or by the addition of a macrophage-inhibiting peptide, the cell fraction enriched with transformed cells is spread out on microtiter plates and multiplied.

D2 is not considered prejudicial to the novelty of the subject matter of Claims 11-14. The applicant has put the case as follows: in the peripheral



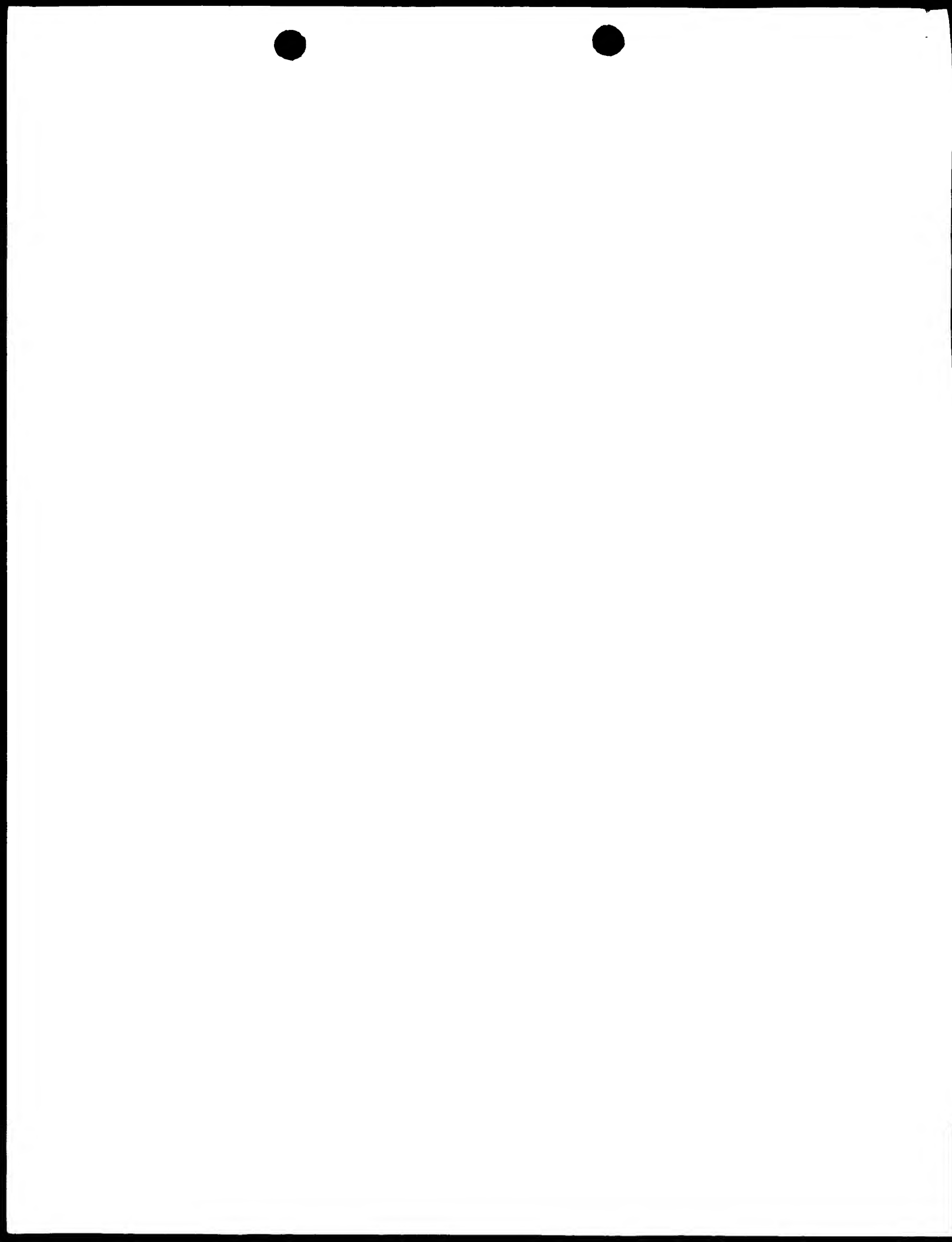
blood, the proportion of NK cells, that is, cells which are eliminated using the anti-CD8 and anti-CD25 antibodies, varies from between 6% and 29% according to the individual. Furthermore, only a sub-population of the NK cells expresses the CD8 antigen. Moreover, resting CD25 cells are CD25-negative. If the absolute number of NK cells in the blood is 80,000 to 1,000 000, there are still at least 56,000 NK cells per ml of blood even after the 30% of CD8-positive NK cells have been removed. The number of disseminated tumour cells does not, however, exceed 10 to 100 cells per ml of blood. Nor does it appear possible for the subsequent cultivation to alter this considerable surplus of non-tumour cells so as to achieve tumour cell proportions of at least 50%.

The IPEA therefore considers it likely that, on the basis of the enriching and subsequent cultivation method of D2, a tumour cell proportion of at least 50% is most probably not obtained.

The subject matter of Claims 15-21 is novel, since it relates to the novel cell mixtures as per Claims 11-14.

Inventive step (PCT Article 33(3))

6. D2 is the closest prior art. In said document, disseminated tumour cells are enriched with the help of centrifugation and subsequent *in vitro* culture. In contrast thereto, the application uses a sieve with a mesh or pore width of 15-30 μm , which retains the circulating tumour cells. The advantage of the method is that it can be carried out quickly and that the cells are obtained in a relatively



unadulterated state without ligand bonding.

The problem addressed by the application is therefore the provision of a method for isolating disseminated tumour cells which is simple to carry out and which leaves the cells in a state corresponding to their natural one.

Example 1 in combination with Example 4 shows that disseminated tumour cells are obtained using the claimed method.

The solution formulated in Claim 1 does not appear to be obvious from the cited prior art. Although D1 describes the separation of tumour cells by filtration, this, as is already mentioned above, relates to larger cell clumps, which are not the same as disseminated tumour cells. In **D3, EP-A-0 483 506**, blood is filtrated so as to separate cells of clinical interest from those which are not of interest. Of clinical interest are those cells which can be coloured using the PAP test, a test for cancer cells. Of non-clinical interest are, for example, red and white blood corpuscles. However, filters are used with a pore width of approx. 12 μm and smaller.

D1 and D3 thus use filters, but, in one case, this is for the separation of non-disseminated tumour cells and, in the other case, no details are given as to the cells retained and the mesh width is different from that chosen in the application. Therefore, it does not seem possible for a person skilled in the art to conclude from the teaching of these two documents that a filter with a mesh width



of 15-30 μm is suitable for the separation of circulating tumour cells.

The subject matter of Claims 1-8 therefore involves an inventive step. This also applies to Claim 9, which contains the method from Claims 1-7 as method steps.

An inventive step can also be acknowledged for the subject matter of Claim 10, since the use of a sieve with a mesh or pore width of approximately 15-30 μm is not proposed in the prior art.

7. D2 could also be considered the prior art closest to the cell Claims 11-14 and those claims which relate thereto. The cell mixtures containing the disseminated tumour cells from D2 contain ligands required for isolation purposes and also are not characterised by the tumour proportion indicated (see above comments with respect to novelty). Therefore, the advantage of the cell mixtures in the present application is that, due to their purity and relatively high content of tumour cells, it is possible, for example, to carry out quantitative analyses of the expression of specific oncobiologically relevant nucleic acids.

Consequently, the subject matter of Claims 11-14 addresses the problem of providing cell mixtures which contain a high proportion of pure, disseminated tumour cells and thus are accessible using modern analytical methods or are suitable for establishing cell lines and as pharmaceutical agents.



Example 4 shows the carrying out of LOH analyses and therefore that the cell mixtures of the application solve the problem.

The subject matter of Claims 11-14 involves an inventive step since the prior art does not propose tumour cells which do not contain the additives necessary for their isolation. Both the aforementioned D2 and **D4 - RYE, P.D. ET AL.:**

'Immunobead filtration: A novel approach for the isolation and propagation of tumor cells' THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Vol. 150, No. 1, 1997, pages 99-106 - use direct or indirect antibodies or other additives (macrophage-inhibiting peptide from D2) for the isolation. Claims 11-14 thus meet the requirements of PCT Article 33(3).

8. Claims 15-20 describe methods and uses of the novel and inventive cell mixtures of Claims 11-14. The subject matter of these claims is thus likewise inventive. This also applies to the pharmaceutical agent in Claim 21.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05386

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day month year)</u>	<u>Filing date (day month year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day month year)</u>
WO-A-9910528	04 March 1999 (04.03.1999)	24 August 1998 (24.08.1998)	22 August 1997 (22.08.1997)

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day month year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day month year)</u>
---------------------------------------	--	--

